

**Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe des Besenginsters
und zur Konstitution von Scoparin**

Peter Beyersdorff

1961



Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe des Besenginsters und

zur Konstitution von Scoparin

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Peter Beyersdorff

aus

Stuttgart

November 1961



Berichterstatter: Professor Dr. L. H ö r h a m m e r

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.1961

I N H A L T S Ü B E R S I C H T

	Seite
E I N L E I T U N G	1
A L L G E M E I N E R T E I L	2
I. Pharmakognostische Prüfung der vom Drogenhandel als Flores Spartii scoparii angebotenen Blüten	2
II. Bisherige Kenntnisse über die Inhaltsstoffe von Sarrothamnus scoparius L.	4
III. Eigene Untersuchungen über das Vorkommen von Flavonen in den Blüten und Stengelteilen von Sarrothamnus scoparius L.	7
1. Voruntersuchung und Extraktbereitung	7
2. Auftrennung der Mischkristallisate mit Hilfe von Perlonsäulen	10
3. Versuche zur Identifizierung der gefundenen Sub- stanzen	12
a) Identifizierung von Substanz A	12
b) Identifizierung von Substanz B	15
c) Versuche zur Identifizierung von Substanz C . .	17
d) Versuche zur Identifizierung von Substanz D . .	18
e) Identifizierung von Substanz E	21
f) Identifizierung von Substanz F	24
g) Versuche zur Identifizierung von Substanz G . .	27
h) Identifizierung von Substanz H	29
IV. Zur Konstitution des Scoparins	33
a) Bisherige Untersuchungen	33
b) Eigene Untersuchungen	35
1. Schmelzpunkt und CH-Analyse	35
2. Azetylierung, Hydrolyseversuche und Entmethylierung	38
3. UV-Messungen (Normalspektren)	40
4. UV-Spektren in Natriumazetatmilieu	41
5. Farbreaktionen auf dem Papierchromatogramm . . .	42
6. Alkaliabbau	43
7. IR-Spektren	43
8. Perjodsäureoxydation	44

EXPERIMENTELLER TEIL	46
1. Methodische Einzelheiten zur Anreicherung und Trennung der Substanzen an Polyamidsäulen	46
a) Bereitung des wässrigen Extraktes	46
b) Herstellung der Mischkristallisate	46
c) Auftrennung der Mischkristallisate an Perlonsäulen und Reinigung der Substanzen	47
2. Papierchromatographische Untersuchungen	53
a) R_F -Werte	53
b) Fluoreszenzfarben im UV-Licht	54
3. Chemische Untersuchungen	55
a) Farbreaktionen	55
b) Quantitative Hydrolysen	58
c) Zuckeranteil	58
d) CH- und CH_3O -Bestimmungen	60
e) Entmethylierung	62
f) Perjodsäureoxydation	64
g) Azetylierungen	65
h) Alkalispaltung	67
i) Mikrosublimation	69
4. Physikalische Untersuchungen	69
a) UV-Spektroskopie	69
1. Normalspektren	69
2. UV-Verschiebungen	70
b) IR-Spektroskopie	71
Herkunft der Testsubstanzen	72
Anhang	73

E i n l e i t u n g

Der Besenginster (*Sarothamnus Scoparius* L.) ist eine in Mitteleuropa weit verbreitete Papilionacee. Als Droge werden die Blüten und das Kraut in Form von Extrakten, Tinkturen und Infusen wegen ihrer Herz- und Uteruswirksamkeit verwendet. Das in der Droge enthaltene Alkaloid Spartein ist auch wesentlicher Bestandteil verschiedener Arzneipräparate^{*)}.

In engster systematischer Beziehung zum Besenginster steht der spanische Ginster (*Spartium junceum* L.), dessen Vorkommen sich im wesentlichen auf das Mittelmeergebiet beschränkt. Auch von ihm werden Drogenteile therapeutisch verwendet.

Obwohl zwischen beiden Ginsterarten deutliche morphologische Unterschiede bestehen, werden die Blüten beider Pflanzen häufig miteinander verwechselt oder verfälscht. Da sich aber beide Drogen in den Inhaltsstoffen erheblich unterscheiden und möglicherweise in der Verwendung von Flores Spartii juncei als Surrogat für Flores Sarothamni scoparii Widersprüche begründet sein können, die trotz zahlreicher Untersuchungen bei dieser Herz-wirksamen Droge in pharmakologischer und therapeutischer Hinsicht immer noch bestehen, wurde in einer früheren Arbeit zunächst *Spartium junceum* chemisch untersucht¹⁾. Das Ergebnis war die Isolierung einer Reihe von Flavonoiden bisher wenig bekannter Struktur.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit sollte nun sein, die Blüten von *Sarothamnus scoparius* in gleicher Weise, d.h. auf das Vorkommen von phenolischen Inhaltsstoffen hin zu untersuchen, da eine papierchromatographische Prüfung¹⁾ schon früher ergeben hatte, daß sich beide Drogen in der Flavonführung unterscheiden.

Im Rahmen dieser Untersuchungen sollte außerdem das bereits im Jahre 1851 von STENHOUSE²⁾ isolierte Flavon Scoparin aus *Sarothamnus scoparius* näher untersucht werden, da es bis heute trotz zahlreicher Arbeiten nicht gelungen war, für dieses Flavonoid eine endgültige Struktur aufzustellen. Diese Untersuchungen waren im Hinblick auf neue pharmakologische Arbeiten mit einer Gegenüberstellung der bisher in beiden Drogen aufgefundenen Inhaltsstoffe abzuschließen.

1) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. H.S.DHINGRA, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch. pharmaz.Ges. 292/64, 83 (1958)

2) J.STENHOUSE, Liebigs Ann.Chem. 78, 15 (1851)

*) siehe Anhang

Allgemeiner Teil

I. Pharmakognostische Prüfung der vom Drogenhandel als Flores Sarrothamni scoparii angebotenen Blüten

Die Verwechslungsmöglichkeiten, die bei den Blüten des Besenginsters mit denen des spanischen Ginsters bestehen, machten es notwendig, unseren Untersuchungen eine eingehende pharmakognostische Prüfung der Handelsdrogen voranzustellen.

Das Farbfoto befindet sich in der Originalarbeit

Sarrothamnus scoparius L. Blütenstand

Nach HEGI³⁾ sind die Kelchlippen des Besenginsters eiförmig. Davon ist die obere zweizählig, die untere dreizählig. Die Krone erscheint leuchtend gelb, die Fahne ist zurückgeschlagen, die Flügel sind stumpf und die Staubblätter am Grunde verwachsen.

3) G. HEGI, "Illustrierte Flora von Mitteleuropa", Verlag J.H. Lehmann, München (1931) Bd. IV/3, S. 1183

Als Unterscheidungsmerkmale können ferner die blattwinkelständigen Blüten und der uhrfederartig eingerollte Griffel gelten⁴⁾ (siehe Abb. 1).

Der Besenginster ist charakterisiert durch tiefgrüne fünfeckige Stengel. Die ganzrandigen Blättchen stehen dreizählig auf kleinen Zweigerhebungen⁵⁾.

Der spanische Ginster besitzt demgegenüber einen zweilippigen Kelch mit zweizähliger Oberlippe und scheidiger, ungeteilter, erst postfloral zerreißender Unterlippe. Die Krone ist heller gelb gefärbt. Die Fahne besitzt einen verkehrt eiförmigen Umriss und hat etwa die Länge des gebogenen zugespitzten Schiffchens. Die Flügel sind länglich, wesentlich kürzer als beim Besenginster, während die Staubfadenröhre mit den Nägeln der Flügel verbunden sind. Der Staubbeutel verfügt über eine starke Behaarung⁶⁾. Im Gegensatz zum Besenginster besitzt der spanische Ginster einen hellgrünen, runden, stark gerillten Stengel.

Das Farbfoto befindet sich in der Originalarbeit

Abb. 2

obere Blütenreihe: Flores *Sarothamni scoparii*
untere Blütenreihe: Flores *Spartii juncei*

4) M.H.MÜHLBERGER u. H.SCHUSTER, "Bäume und Sträucher", Verlag O. Maier, Ravensburg (1960), S. 43

5) O.SCHMEIL u. J.FITSCHEN, "Flora von Deutschland", Verlag Quelle u. Meyer, Heidelberg (1959), S. 129/4

6) G.HEGI, "Illustrierte Flora von Mitteleuropa", Verlag J.H.Lehmann, München (1931), Bd.IV/3, S. 1213

Während die Blütenmerkmale beider Ginsterarten im frischen Zustande eine Unterscheidung ohne weiteres zulassen, gestaltet sich die Erkennung getrockneter und vermischter Blüten wesentlich schwieriger. Die Gegenüberstellung in Abb. 2 zeigt jedoch, daß abgesehen von der Verschiedenheit der Kelche, alle Blüten-
teile des Besenginsters abgerundet sind, während die Blüten des spanischen Ginsters zu einer gebogenen Spitze auslaufen. Besenginsterblüten unterliegen auch einer größeren Schrumpfung, während spanische Ginsterblüten durch einen größeren Wachsgehalt spröde erscheinen.

Keine Unterscheidungsschwierigkeiten bereiten dagegen die sehr unterschiedlichen Stengel beider Drogen.

Die vom Großhandel angebotene Stengelware des Besenginsters war in jedem Fall unverfälscht. Die Blütenware zeigte jedoch pharmakognostisch kein einheitliches Bild. Sie bestand entweder aus einer Mischung von Besenginsterblüten und spanischen Ginsterblüten oder enthielt praktisch nur Blüten des spanischen Ginsters. Für unsere Isolierungsarbeiten waren wir deshalb auf selbst gesammelte Besenginsterblüten angewiesen.

II. Bisherige Kenntnisse über die Inhaltsstoffe von *Sarothamnus scoparius* L.

Eine Reihe von Verbindungen wurden bereits aus dem Besenginster isoliert. Dazu gehören von den A l k a l o i d e n das Spartein, das sowohl in der l-Form wie in der d-Form vorkommt und das Genistein, Sarothamnin und Pachycarpin⁷⁾⁸⁾. An C a r b o c y c l i -
s c h e n B a s e n konnten bisher Tyramin, Oxytyramin und N-Methyloxytyramin aufgefunden werden⁹⁾. Von den U n v e r -
s e i f b a r e n B e s t a n d t e i l e n sind bisher

7) F.CORCILIUS, *Planta med.* 4, 104-110 (1956)

8) R.A.MAYER, *Pharm.Zh.* 88, 120 (1949)

9) F.JAMINET, *ref. Chem.Ztrbl.* 3, 2537 (1956)

β -Sitosterin, n-Octadecan - 1.18 - diol, Hexakosan - 1.26 - diol, ein Gemisch von isomeren Alkoholen ($C_{24}H_{50}O$) und Alkohole der Summenformel $C_{16}H_{32}O$, $C_{22}H_{46}O$, $C_{23}H_{48}O$ und $C_{14}H_{28}O$ in der Literatur erwähnt¹⁰⁾. Wir fanden außerdem Angaben über das Vorkommen von ätherischem Öl, von Furfurol, Gerbstoff, Bitterstoff und Harz¹¹⁾, sowie von vier weiteren chemisch noch nicht bestimmten Basen¹²⁾.

Als Inhaltsstoff mit F l a v o n c h a r a k t e r kann nur das von STENHOUSE¹³⁾ im Jahre 1851 aus den Blüten isolierte Scoparin gesichert gelten. Dieser Stoff war Gegenstand vieler Untersuchungen, ohne daß es bis heute gelungen ist, seine Struktur endgültig festzulegen. MASCRE und PARIS¹⁴⁾, die sich im Jahre 1937 zuletzt um die Sicherstellung der Konstitution des Scoparins bemühten, und dieses ohne endgültige Beweismittel als ein Rhamnosid des Quercetolmonomethyläthers bezeichneten, erwähnen in ihren Arbeiten keine weitere Flavonverbindung.

Im Jahre 1957 haben sich die französischen Forscher FAUGERAS, JANOT und PARIS¹⁵⁾ in elektrophoretischen Studien mit den Flavonoiden des Besenginsters beschäftigt und neben dem Scoparin in den Zweigen, in den Blättern und in den Schoten drei weitere unbekannte Flavone gefunden. In den Samen fanden sie ein viertes unbekanntes Flavon.

Zur gleichen Zeit wurde an unserem Institut bei papierchromatographischen Vergleichen zwischen den Blüten des spanischen Ginsters und des Besenginsters von DHINGRA¹⁶⁾ die Anwesenheit von zwei Flavonoiden neben Scoparin ermittelt.

10) F.CORCILIUS, ref. Chem.Ztrbl. 5, 5058 (1957)

11) G.KLEIN, "Handbuch der Pflanzenanalyse", Verlag J.Springer, Wien (1932), Bd. II/2, S. 940

12) D.K.WINTERFELD u. F.NIETSCHKE, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz. Ges. 278/393, 101 (1940)

13) J.STENHOUSE, Ann.Chem.u.Pharm. 78, 15 (1851)

14) M.MASCRE u. R.PARIS, Bull.Sci.pharmacol. 44, 101 (1937)

15) G.FAUGERAS, M.JANOT u. R.PARIS, Travaux de matière medicale et de pharmacie galenique, Paris (1957), S. 76

16) H.S.DHINGRA, Dissertation München (1957)

In Klein's "Handbuch der Pflanzenanalyse"¹⁷⁾ und in Hager's "Handbuch der pharmazeutischen Praxis"¹⁸⁾ fanden wir das Isoflavon Genistein als Spaltprodukt des Glucosids Genistin, sowie das Aglycon Luteolin als Inhaltsstoff des Besenginsters referiert. Beim Studium der entsprechenden Literaturstellen verwies das Handbuch der Pflanzenanalyse auf die Arbeit von WALZ¹⁹⁾. Wir suchten diese Literaturstelle auf und fanden, daß sich die betreffende Arbeit auf die Isolierung von Genistin aus Soja hispida Moench bezog. GESSNER²⁰⁾ weist jedoch ausdrücklich darauf hin, daß Genistein - hier ist das gleichnamige Alkaloid gemeint - nicht verwechselt werden darf mit dem Flavonderivat aus den Blüten von Genista tinctoria L. (Färberginster).

In einer Arbeit von KETTELBACH²¹⁾ wird das bisher als Genistein bezeichnete Alkaloid des Besenginsters als 1- α -Isosparteine neu definiert.

Als bezeichnend für die Unklarheiten bezüglich des Genisteins erscheint uns die Angabe des Autors HAFERKAMP²²⁾ der für Besenginster drei Flavone angibt. Er rechnet dazu Scoparin, Genistein (Prunetol) und das Glucosid des Prunetols, wobei er auf einige Literaturstellen verweist²³⁾²⁴⁾²⁵⁾. Eine Überprüfung dieser Angaben führte uns²³⁾²⁴⁾ zur Feststellung, daß Genistein aus *Genista tinctoria*²⁶⁾²⁷⁾ (Färberginster) mit Prunetol identisch ist und zu einer Schilderung²⁶⁾ seiner Synthese.

17) G. KLEIN, "Handbuch der Pflanzenanalyse", Verlag J. Springer, Wien (1932) Bd. II/2, S. 940

18) J. HAGER, "Handbuch der pharmazeutischen Praxis", Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1949), 1. Erg. Bd., S. 613

19) E. WALZ, Liebigs Ann. Chem. 489, 118 (1931)

20) O. GESSNER, "Die Gift- und Arzneipflanzen von Mitteleuropa", Verlag K. Winter (1953) S. 55

21) D. KETTELBACH, M. RING u. K. WINTERFELD, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 287/59, 1 (1953)

22) H. HAFERKAMP, Hippokrates 21, 668 (1950)

23) W. BAKER u. R. ROBINSON, J. chem. Soc. (London) 2, 1981 (1925)

24) W. BAKER u. R. ROBINSON, J. chem. Soc. (London) 2, 2713 (1926)

25) W. BAKER u. R. ROBINSON, J. chem. Soc. (London) 2, 3117 (1928)

26) A. G. PERKIN, P. G. NEWBURY, J. chem. Soc. (London) 75, 830 (1899)

27) A. G. PERKIN u. L. H. HORSFELD, J. chem. Soc. (London) 77, 1310 (1900)

Da die Blüten des Besenginsters unter den Bezeichnungen Flores Spartii scoparii, Flores Sarothamni scoparii, Flores Genistae scoparii²⁸⁾ und auch unter dem nur den Blüten des F ä r - berg i n s t e r s zukommenden Namen F l o r e s G e - n i s t a e t i n c t . gehandelt werden, sind derartige fehlerhafte Zitate nicht verwunderlich.

III. Eigene Untersuchungen über das Vorkommen von Flavonen in den Blüten und Stengelteilen von Sarothamnus scoparius L.

1. Voruntersuchung und Extraktbereitung

Wir sammelten für unsere Isolierungsarbeiten 11 kg frische Besenginsterblüten in den ersten Tagen des Monats Mai 1959 an der Autobahnstrecke Pforzheim-Karlsruhe bei Langensteinbach. Soweit wir Stengelteile bzw. Herbadroge benötigten, bezogen wir diese vom pharmazeutischen Großhandel.

Zur Erkennung der in der Pflanze vorliegenden Flavone chromatographierten wir einen methanolischen Probeextrakt in Äthylazetat/Ameisensäure/Wasser (10+2+3)^{*)}, konnten aber wegen starker Schwanzbildung keine exakte Aussage über die Anzahl der vorliegenden Flavone machen. Auffallend waren jedoch drei im UV-Licht blau fluoreszierende Stoffe. Wir versuchten eine Differenzierung durch selektive Extraktion mit Methanol, Äthylazetat, Äther und Chloroform zu erreichen, konnten aber mit keiner dieser Lösungen eine Trennung der Flavone von den blau fluoreszierenden Substanzen erreichen oder einzelne Flavone besonders anreichern. Aus diesem Grund zogen wir das Pflanzenmaterial nach der üblichen Methode im Soxhlet mit Methanol aus, entfernten das Lösungsmittel durch Destillation und nahmen den Rückstand mit einem Überschuß heißen Wassers auf. Nach dem Abkühlen hatten sich beträchtliche Mengen von Ballaststoffen abgeschieden. Diese trennten wir durch Zentrifugieren von der flüssigen Phase ab, wuschen die eingeschlossenen Flavone mit Wasser

28) H.A.HOPPE, "Drogenkunde", Verlag Cram de Gruyter u.Co.,Hamburg (1958), S. 307/308

*) Nachstehend als ÄAW bezeichnet.

aus und verwarfen die Rückstände. Die somit vorgereinigte wässrige Lösung war klar durchsichtig braun gefärbt.

Für die Chromatographie und zur Herstellung eines Mischkristallisates reicherten wir die Inhaltsstoffe durch Perforation des wässrigen Extraktes mit Äther und Äthylazetat an. Die vereinigten Äther- bzw. Äthylazetatfraktionen reinigten wir durch Abdestillieren des Lösungsmittels, Aufnahme der braunen sirupösen Rückstände mit heißem Wasser und erneute Perforation. Nach dem Einengen der Phasen erhielten wir ein trockenes hellbraunes Mischkristallisat. Von diesem lösten wir jeweils einen Teil in wenig Methanol und prüften papierchromatographisch die qualitative Zusammensetzung. Dabei konnten wir mit dem Laufmittel Butanol/Eisessig/Wasser (4+1+5)^{*)} die günstigste Auftrennung erreichen. Wir stellten fest, daß sich in allen Teilen der Pflanze die gleichen Inhaltsstoffe finden und nur in quantitativer Hinsicht Unterschiede bestanden. Die Verbindungen A,B,C,D,E und G (siehe Abb. 3) fluoreszierten dunkelbraun. Die Substanz F erschien neben zwei weiteren schwächer blau fluoreszierenden Stoffen hellblau gefärbt. Aus dem folgenden Chromatogrammschema ist die ungefähre quantitative Verteilung der Verbindungen in Blüten- und Herbaauszügen ersichtlich.

^{*)} künftig als BEW bezeichnet.

Flores Sarothamni scoparii

Herba Sarothamni scoparii

O + O +	G F	O + O ++
O ++	E	O +++
O + O +	D C	O - O -
O +++ O ++	B A	O +++ O +

Abb. 3

Chromatogrammschema der papierchromatographisch
aufgefundenen Substanzen

Laufmittel: Butanol/Eisessig/Wasser (4+1+5)

- + = geringe Konzentration
- ++ = mittlere Konzentration
- +++ = starke Konzentration
- (-) = eben noch nachweisbar

2. Auftrennung der Mischkristallisate mit Hilfe von Perlonsäulen

Die aufgefundenen Glykoside lagen in einem so komplexen Gemisch vor, daß nicht erwartet werden konnte, diese allein durch fraktionierte Kristallisation rein zu erhalten. Da sich bei vielen Glykosidtrennungen an unserem Institut die erstmals von HÖRHAMMER und Mitarbeitern²⁹⁾³⁰⁾³¹⁾ auf dem Gebiet der Flavone angewandte Polyamidchromatographie bewährt hatte, machten wir auch hier von ihr Gebrauch.

Zur Auftrennung der papierchromatographisch nachweisbaren Stoffe benutzten wir eine bis zu einer Füllhöhe von 1.10 m mit Ultramidpulver beschickte Glassäule. Für die Aufschlammung des Perlons und anschließende Elution verwendeten wir 90%iges Methanol. Dieses Lösungsmittel hatte sich nach einer Reihe von Versuchen als sehr günstig erwiesen.

Im ersten Auftrennungsgang fingen wir 66 Fraktionen von je 110 ml auf. Die papierchromatographische Untersuchung zeigte, daß die Fraktionen 1 - 18 (siehe Tab. 1) vorwiegend Substanz F als blau fluoreszierenden Stoff neben zwei schwach dunkel erscheinenden Flecken enthielten, die wir Substanz E und G zuordneten. In den Fraktionen 19 - 37 waren neben wenig Substanz E die Stoffe D, C und B angereichert. Die Prüfung der Eluate 38 - 44 ergab neben Substanz D und wenig C Substanz B einen schwachen Fleck, der Substanz A auf dem Chromatogrammschema entsprach. In den Fraktionen 45 - 53 fanden wir Substanz A neben B vermehrt und in den letzten Lösungen 54 - 66 fast nur noch reines Glykosid A.

Aus den vereinigten Eluaten 19 - 53 fiel nach Konzentration Glykosid B in hydratisierter Form aus. Wir trennten die Fällung durch Abnutschen von der Stammlösung, trockneten in einer Trockenpistole und chromatographierten erneut. Die

-
- 29) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. W.LEEB, Naturw. 44, 513 (1957)
30) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. J.IZQUIERDO-SORLI u. L.ENDRESS, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharm.Ges. 291/63, 268 (1958)
31) L.HÖRHAMMER u. H.WAGNER, Pharmaz.Ztg. 738 (1959)

ausgefallene Substanz, die aus den zwei Glykosiden B und A bestand, wurde durch eine zweite Verteilung an einer kurzen Perlonsäule aufgetrennt. Wir erhielten dabei G l y k o s i d B i n e i n e r M e n g e v o n 5 0 0 m g .

Die Lösungen 1 - 18 und 19 - 53 wurden vereinigt, konzentriert und nochmals über eine große Perlonsäule gegeben. Aus den ersten fünf Fraktionen erhielten wir 2 0 m g S u b - s t a n z G und nach längerem Stehen eine Mischung der Substanzen E und F, die sich durch fraktionierte Kristallisation rein darstellen ließen. Dabei fiel S u b s t a n z E in einer Menge von 3 0 0 m g und S u b s t a n z F in einer Ausbeute von 3 5 0 m g a n .

Die weitere Aufarbeitung der Fraktionen erbrachte durch Säulenchromatographie 6 0 m g G l y k o s i d D und 1 5 m g G l y k o s i d C . Die fast nur noch Glykosid A enthaltenden Stammlösungen 54 - 66 der ersten Trennung führten nach Konzentration und längerem Stehen zu 2 3 0 m g G l y k o s i d A .

T a b e l l e 1

Inhalt der Fraktionen 1 - 66

Fraktion	1 - 18	Substanz	<u>F</u> , E, G
Fraktion	19 - 37	Substanz	<u>E</u> , <u>D</u> , <u>C</u> , B
Fraktion	38 - 44	Substanz	D, C, <u>E</u> , A
Fraktion	45 - 53	Substanz	<u>A</u> , <u>B</u> ,
Fraktion	54 - 66	Substanz	<u>A</u> , (B),

3. Versuche zur Identifizierung der gefundenen Substanzen

a) Identifizierung von Substanz A

Die in Methanol sehr schwer lösliche Substanz A ergab nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Methanol/Wasser einen Schmelzpunkt von 265 - 267°C. Sie war in Form feinsten Nadeln mikrokristallin und von hellgelber Farbe.

Der Reduktionstest mit Zink und Salzsäure bestätigte durch das Auftreten einer Rotfärbung die Zugehörigkeit der Substanz zur Flavonreihe³²⁾.

Mit Eisenchloridlösung zeigte Substanz A Braunfärbung, die nach Zugabe von zwei Tropfen Salzsäure in Grün umschlug und beim Neutralisieren mit Natriumazetat wieder erschien. Nach BRIGGS und LOCKER³³⁾ deutet diese Farbreaktion auf eine freie Hydroxylgruppe am C-Atom 5 hin.

Der Zirkonoxychlorid-Zitronensäure-Sprühtest³⁴⁾ war negativ, so daß eine freie Hydroxylgruppe am C-Atom 3 auszuschließen und eine freie Hydroxylgruppe am C-Atom 5 zu vermuten war.

Mehrere Versuche, die Substanz mit Mineralsäuren zu einem Aglykon zu hydrolysieren, blieben ohne Erfolg.

Die bei 257 m μ und 351 m μ aufgefundenen Maxima des UV-Spektrums lagen in dem für Flavone typischen Wellenbereich zwischen 240 - 270 m μ und 330 - 350 m μ .

Da Substanz A unseren Ergebnissen entsprechend weder am C-Atom 3, noch am C-Atom 5 verglykosidiert sein konnte und nicht hydrolysierbar war, bestand die Möglichkeit einer Zuckerverknüpfung am C-Atom 8, nachdem kürzlich solche Verbindungen mit ähnlichen Eigenschaften in mehreren Pflanzen und auch im *Spartium juncceum* aufgefunden worden waren³⁵⁾.

32) R.WILLSTÄTTER u. H.MALLISON, S.B.preuss.Akad.Wiss.phys.math.Kl. 769 (1914)

33) L.H.BRIGGS u. R.H.LOCKER, J.chem.Soc.(London) 3131 (1951)

34) L.HÖRHAMMER u. R.HÄNSEL, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 284/56, 276 (1951)

35) L.HÖRHAMMER u. H.WAGNER, "Phenolic C-C- Glycosids" Paper presented at a symposium on Current Chemical Research on Plant Phenolics, April 1960, Egham (to be published by Pergamon Press) (1961)

Wir verglichen deshalb die ermittelten CH-Werte mit denen des Vitexins und Orientins. Übereinstimmung bestand mit den CH-Werten des Orientins, für das die Summenformel $C_{21}H_{20}O_{11}$ (448) gilt.

Zum weiteren Nachweis der Identität beider Substanzen stellten wir das Azetylprodukt von Substanz A her. Der Schmelzpunkt lag bei 215°C . Die Azetylgruppenbestimmung ergab 42.05% CH_3CO und entsprach den geforderten Werten für ein Octaazetat unter Zugrundelegung der Formel $C_{21}H_{12}O_3 (\text{COCH}_3)_8$.

Einen Mischschmelzpunkt mit authentischem Orientin konnten wir nicht durchführen, da unsere Verbindung einen höheren Schmelzpunkt zeigte als die authentische Probe. Ebenso war ein Vergleich mit dem früher gewonnenen Azetat nicht möglich, da dieses amorph war.

In verschiedenen Lösungsmittelsystemen chromatographiert zeigte Substanz A mit Orientin die gleichen Laufhöhen. Nach dem Besprühen mit Aluminiumchlorid und basischem Bleiazetat ergab die Substanz die typischen Komplexfarben für eine Dihydroxygruppierung im Ring B (siehe Tab.6).

Zur endgültigen Bestätigung der Identität beider Substanzen verglichen wir das IR-Spektrum unserer Substanz mit dem Spektrum des aus *Spartium junceum* gewonnenen Orientins³⁶⁾.

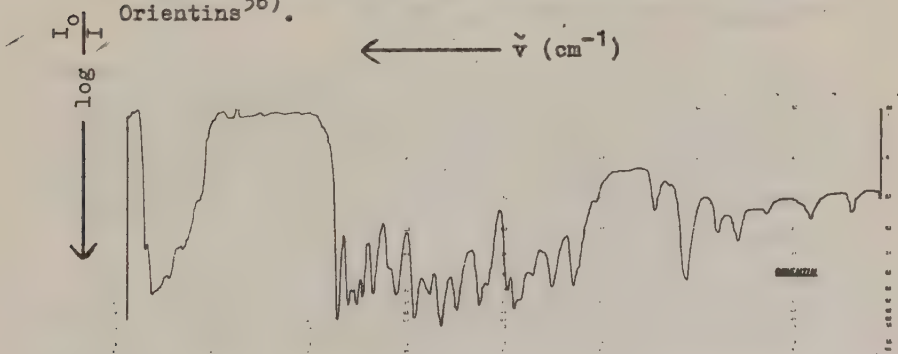


Abb. 4

IR-Spektrum von Substanz A

36) H.S.DHINGRA, Dissertation München (1958)

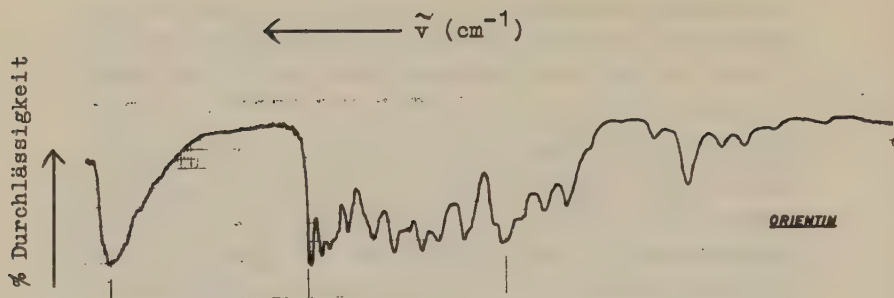


Abb. 5
IR-Spektrum von auth. Orientin

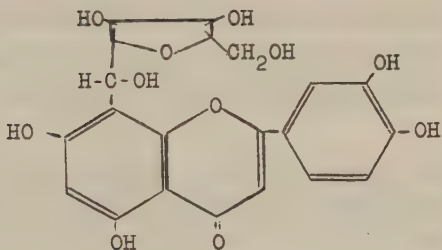
Es herrscht völlige Übereinstimmung im Kurvenverlauf, namentlich im Bereich der Banden 680 cm^{-1} - 860 cm^{-1} , die über die Substitutionsverhältnisse im Seitenphenyl Aufschluß geben. Wie bereits in früheren Arbeiten festgestellt wurde, ist die Disubstitution im Seitenphenyl wie im Falle von Luteolin durch die Bandenfolge 863 cm^{-1} , 840 cm^{-1} und 820 cm^{-1} im Bereich der γ -Schwingungen gekennzeichnet. Monosubstitution, wie sie für Apigenin typisch ist, wird im Infrarotspektrum durch eine starke Absorption bei 835 cm^{-1} angezeigt.

Entsprechend früheren Arbeiten³⁷⁾³⁸⁾ haben wir in unserem Orientin das Luteolin-Analogon zu dem von EVANS und Mitarbeitern³⁹⁾ in seiner Konstitution aufgeklärten Apigeninderivat Vitexin zu sehen. Wie beim Vitexin liegt hier kein eigentliches Flavonglykosid, sondern eine Flavonglykosylverbindung vor.

In Analogie zum Vitexin besitzt *O r i e n t i n* als Luteolinderivat mit einem $\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_4$ -Rest am C-Atom 8 folgende Konstitution.

-
- 37) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. F.GLOGGENGIESSER, Arch.Pharmaz.Ber. dtsh.pharmaz.Ges. 291/63, 126 (1957)
 38) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER, H.NIESCHLAG u. G.WILDI, Arch.Pharmaz.Ber. dtsh.pharmaz.Ges. 292/64, 381 (1959)
 39) W.H.EVANS, A.MCGOOKIN, L.JURD, A.ROBERTSON u. W.R.N.WILLIAMSON, J.chem.Soc.(London) 3510 (1957)

Formelbild 1



O r i e n t i n

Damit enthält auch *Sarothamnus scoparius* entgegen den Angaben von DHINGRA⁴⁰⁾ das C-Glykosid Orientin.

b) Identifizierung von Substanz B

Auf Grund der intensiven Farbreaktion, die diese Verbindung auf dem Papierchromatogramm gab, vermuteten wir in ihr das einzige bisher aus dem *Besenginster* isolierte, in seiner Konstitution aber noch unbekannte Hauptglykosid Scoparin⁴¹⁾.

Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Aceton/Wasser erhielten wir ein hellgelbes mikrokristallines Pulver, das in Form langer, zu strahlenförmigen Verbänden zusammengefaßter Nadeln auskristallisierte. Der Schmelzpunkt lag bei 253°C.

Einen Mischschmelzpunkt mit der von Herrn Professor Dr. R. Paris freundlich überlassenen Testsubstanz^{*)} konnten wir nicht durchführen, da diese ohne jede Kristallform vorlag und unter Zersetzung zwischen 190 - 240°C schmolz.

Zum Vergleich chromatographierten wir beide Substanzen in verschiedenen Lösungsmittelsystemen und stellten Sprüh-test an. Die R_f -Werte waren gleich. Der zunächst unter UV-Licht dunkel fluoreszierende Fleck führte nach Behand-

40) L.HÖRHALMER, H.WAGNER u. H.S.DHINGRA, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch. pharmaz.Ges. 292/64, 83 (1958)

41) J.STENHOUSE, Ann.der Chem.u.Pharm. 78, 15 (1851)

*) Herrn Professor Dr. R. Paris, Faculté de Pharmazie, Laboratoire de Matière Médical, Paris, danken wir für die freundliche Überlassung der Testsubstanzen.

lung mit Aluminiumchloridlösung ebenso wie nach dem Besprühen mit basischem Bleiazetat zu einer Gelbfärbung.

Die UV-spektrophotometrischen Messungen ergaben für beide Substanzen die gleichen Maxima, und zwar bei 271 m μ und 346 m μ .

Als endgültigen Beweis für die Identität unserer Substanz mit Scoparin fertigten wir eine Überlagerungsaufnahme der Infrarotspektren an und fanden gute Übereinstimmung im Kurvenverlauf.

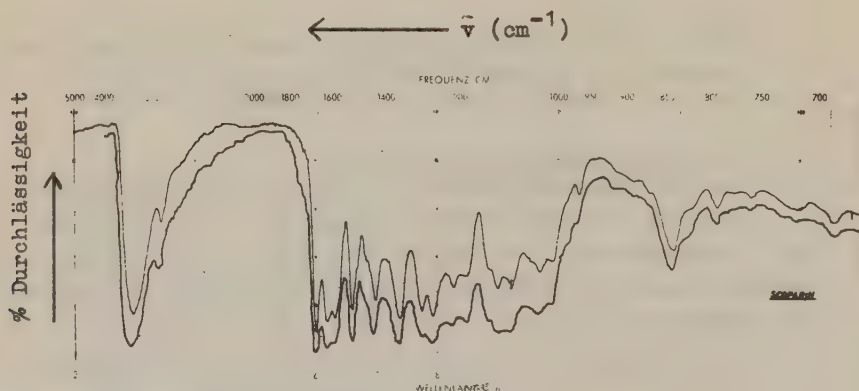


Abb. 6

Überlagerungsaufnahme der IR-Spektren von Scoparin und Substanz B

Wir versuchten die Substanz zu hydrolysieren, konnten aber keine Aufspaltung erreichen. Dieses Ergebnis stand mit den bisherigen Untersuchungen früherer Autoren im Einklang. Auf Grund der schweren Hydrolysierbarkeit lag auch hier die Vermutung nahe, daß eine dem Orientin oder Vitexin ähnliche Struktur zu erwarten war.

Über Versuche zur endgültigen Strukturaufklärung berichten wir in einem eigenen Kapitel (siehe S.33).

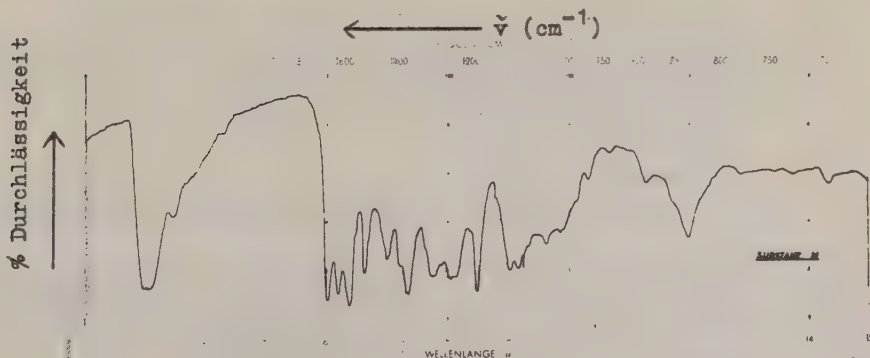
c) Versuche zur Identifizierung von Substanz C

Die in sehr geringer Menge angefallene Substanz C zeigte nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Methanol-Wasser einen Schmelzpunkt von 250°C . Sie war mikrokristallin und von gelber Farbe.

Der Reduktionstest verlief positiv, so daß Substanz C als Flavonderivat anzusehen war. Die R_F -Werte lagen bei 0.33 (ÄAW), 0.43 (IAW) und 0.38 (BEW). Mit Aluminiumchlorid behandelt fluoreszierte die unter dem UV-Licht zuvor dunkel erscheinende Substanz mattgrün und nach Besprühen mit basischem Bleiazetat grüngelb.

Das UV-Spektrum bestätigte die Flavonnatur, da das zweite Maximum bei $330\text{ m}\mu$, also ziemlich kurzwellig lag. Im IR-Spektrum erschien bei 840 cm^{-1} eine auffallend starke Bande, die typisch für ein monosubstituiertes Seitenphenyl ist. Der übrige Kurvenverlauf in den angrenzenden Bereich entsprach dem des Apigenins.

Nachdem verschiedene Hydrolyseversuche mit Mineralsäuren zu keiner Spaltung führten, lag auch hier wieder die Vermutung nahe, daß ein C-Glykosid vorliegen könnte. Ein IR-Vergleich mit Vitexin bestätigte diesen Verdacht. Beide Verbindungen stimmen hierin gut überein. Offenbar war aber die Substanz noch nicht ganz rein, da sowohl der Schmelzpunkt als auch die CH-Werte Abweichungen zeigten. Eine Wiederholung der Elementaranalyse war wegen der geringen Substanzmenge nicht mehr möglich.



Infrarotspektrum von Substanz C

Abb. 7

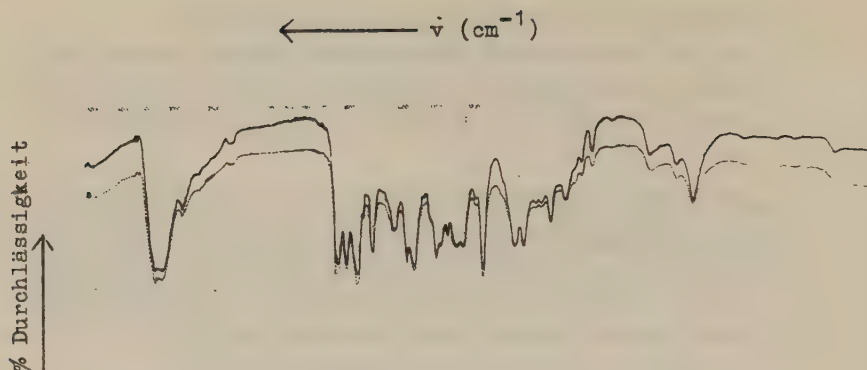


Abb. 8
Infrarotspektrum von Vitexin auth.

Die Tatsache, daß neben Orientin in dieser Pflanze auch das Apigeninanalogen Vitexin auftritt, steht in Übereinstimmung mit zahlreichen ähnlichen Befunden. So konnten HÖRHAMMER und Mitarbeiter⁴²⁾ bei ihren Untersuchungen über das Vorkommen von Flavonen in einheimischen Umbelliferen häufig die Kombination Apigenin-Luteolin nachweisen. Über die gleiche Beobachtung berichteten OYAMADA⁴³⁾, KUBOTA⁴⁴⁾ und GEISMAN⁴⁵⁾.

d) Versuche zur Identifizierung von Substanz D

Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Methanol erhielten wir 60 mg Substanz D in Form kleiner Nadeln. Der Schmelzpunkt lag bei 229°C.

Die Reduktion mit Magnesium Salzsäure verlief positiv und zeigte ein Flavonderivat an. Auf Grund des positiven Zirkon-Zitronensäuretestes war eine Verglykosidierung am C-Atom 3 zu erwarten.

Wir führten mit der Substanz eine quantitative Hydrolyse mit 10%iger Salzsäure durch und erhielten 62.04% Aglykon,

42) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. H.GÖTZ, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz. Ges. 291/63, 48 (1957)

43) T.OYAMADA, J.chem.Soc. Japan, 55, 755 (1934)

44) T.KUBOTA u. M.KOTAKE, Liebigs Ann.Chem. 544, 253 (1902)

45) T.A.GEISSMAN, J.Amer.chem.Soc. 64, 1704 (1942)

so daß Substanz D ein Monosid sein mußte. Den Zuckeranteil konnten wir auf dem Papierchromatogramm als *Galaktose* identifizieren. Durch die Darstellung des Osazons und den Mischschmelzpunkt ließ sich dies bestätigen. Der Schmelzpunkt lag bei 188°C.

Die Lage der R_f -Werte (0.78, 0.65, 0.15) und die Maxima des UV-Spektrums, die man bei 360 m μ und 258 m μ findet, deuteten auf das Quercetinderivat Hyperosid hin. In drei verschiedenen Lösungsmittelsystemen chromatographiert (siehe Tab. 4), zeigte Substanz D die gleichen Laufhöhen wie Hyperosid aus *Betula verrucosa*.⁴⁶⁾ Ebenso stimmten die nach Besprühen mit Aluminiumchloridlösung und basischem Bleiazetat auftretenden Farben bei den Substanzen überein.

Nach dem Umkristallisieren aus Methanol/Wasser gelangten wir zu einem schmelzpunktreinem Aglucon (Smp. = 298°C), das auch auf dem Papierchromatogramm mit Quercetin übereinstimmte. Beweisend waren außerdem die elementaranalytischen Daten (siehe Tab. 11) und das UV-Spektrum, das durch Maxima bei 255 m μ und 370 m μ gekennzeichnet war.

Für Hyperosid von der Formel $C_{21}H_{20}O_{12}$ (464.2) wären die CH-Werte 54.31 C % und 4.34 H % zu erwarten gewesen. Die gefundenen CH-Werte wichen auch hier etwas davon ab. Die Elementaranalyse des Aglucons Quercetin dagegen erbrachte bessere Übereinstimmung mit den geforderten Werten für die authentische Substanz (siehe Tabelle 11).

In IR-Spektren kamen diese Verunreinigungen nicht zum Ausdruck. Die Kurven unserer Substanz und eines Testhyperosids stimmten mit Ausnahme kleiner Abweichungen gut überein, so daß eine Identität mit Hyperosid nicht mehr zweifelhaft ist.

46) E. SEEGER, Dissertation München (1939).

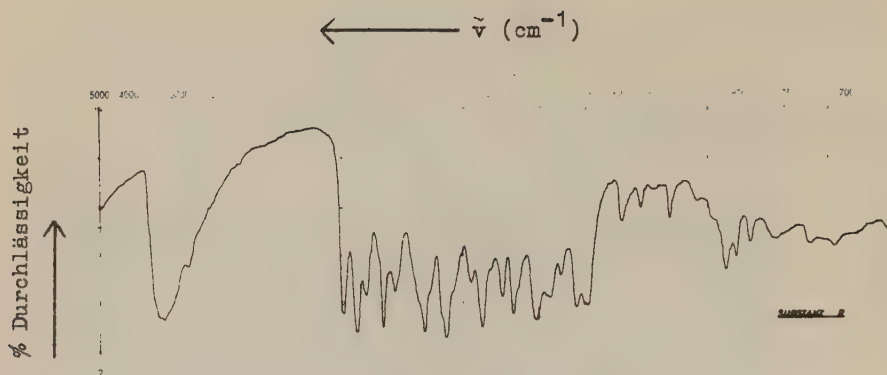


Abb. 9
IR-Spektrum von Substanz D

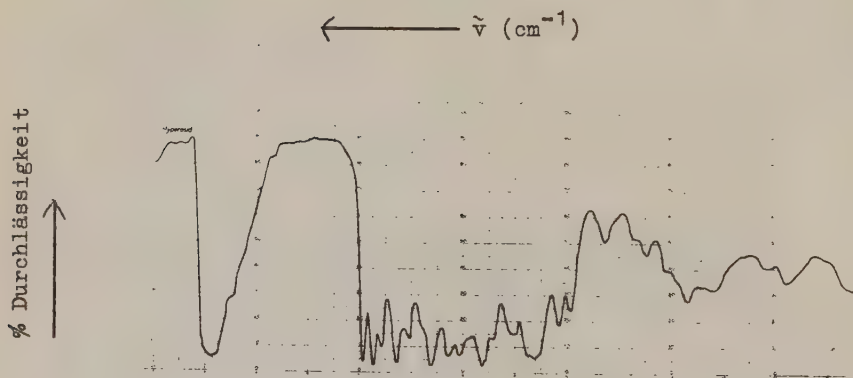
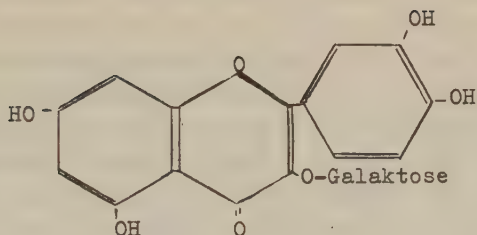


Abb. 10
IR-Spektrum von Hyperosid

Das im Pflanzenreich ziemlich weitverbreitete Quercetin-3-galaktosid ist somit ein weiterer Bestandteil der Inhaltsstoffe des Besenginsters. Die Verbindung besitzt folgende Konstitution.

Formelbild 2



Hyperosid

e) Identifizierung von Substanz E

Nach dem Umkristallisieren aus Methanol/Wasser lag Substanz E in feinen weißen mikrokristallinen Blättchen vor und schmolz bei 251°C.

Der Reduktionstest verlief negativ und die UV-spektrophotometrischen Messungen ergaben nur ein Maximum bei 263 mμ sowie eine Inflexion bei 325 mμ. Spektren dieser Struktur findet man unter den Flavonoiden nur bei Flavanonon oder Isoflavonen⁴⁷⁾⁴⁸⁾⁴⁹⁾⁵⁰⁾.

Wir führten mit der Substanz eine quantitative Hydrolyse mit 10%iger Salzsäure durch und erhielten 61.07% Aglukon. Aus der neutralisierten und eingeeengten Hydrolysenflüssigkeit identifizierten wir den Zuckeranteil durch Papierchromatographie und Darstellung des Osazons. Auf dem Papierchromatogramm ließ sich einwandfrei Glukose als Spaltprodukt nachweisen, ebenso entsprach der Schmelzpunkt des Osazons bei 198°C dem für Glukosazon geforderten Wert. Das Aglukon schmolz bei 289 - 292°C.

47) H.GRASMAIER, Dissertation München (1959)

48) W.K.WARBURTON, Quart.Rev. 8, 67 (1954)

49) R.BOGNAR, V.SZABO u. R.E.DÁVID, Acta Phys.et Chem.Szeged 3, 6 (1959)

50) K.VENKATARAMAN in Zechmeister's "Fortschr. der Chemie org. Naturstoffe", Wien, Springer-Verlag (1959) S. 1

Um die Zahl der vorhandenen Hydroxylgruppen zu ermitteln, azetylierten wir in bekannter Weise und erhielten ein Azetylprodukt vom Smp. = 182°C , das beim Verseifen 6 Mol Essigsäure lieferte. Diese für das Azetat aufgefundenen Werte (siehe Tab. 15 u. 16) entsprachen unter Berücksichtigung des Vorliegens von Glucose den Daten eines Monoglukosides, wobei dann für das Aglukon noch drei OH-Gruppen übrig blieben. Wir bezogen deshalb die Werte der Elementaranalyse auf die Summenformel $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$ (432) und fanden unsere Werte (58.40 C% und 4.98 H%) in bester Übereinstimmung mit den hierfür berechneten Daten 58.35 C% und 4.63 H%. Auch die mikroanalytischen Daten des Aglukons stimmten mit den für ein Trihydroxyflavon berechneten Werten, bezogen auf die Summenformel $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$ (270), gut überein (siehe Tabelle 11)

Da auf Grund des UV-Spektrums und anderer Reaktionen das Vorliegen einer Flavonstruktur ausschied, mußte in Substanz E ein Genistein-monoglukosid vorliegen. Wir verglichen daraufhin das IR-Spektrum mit dem in Frage kommenden Genistin und fanden, daß es sich um das Genistein-7-monoglukosid handelte.

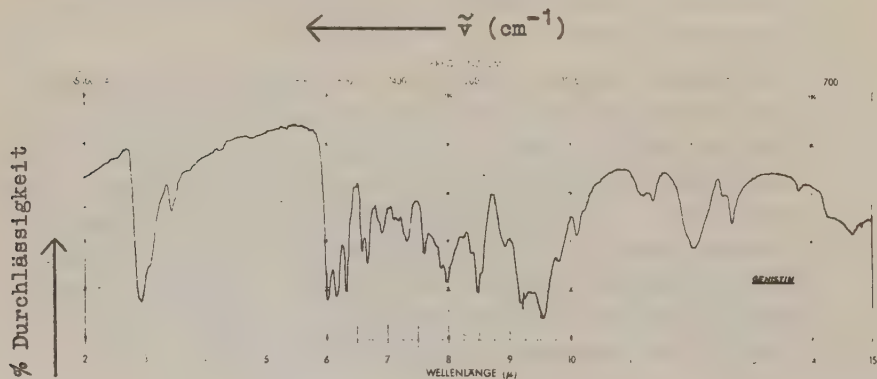


Abb. 11
IR-Spektrum von Substanz E

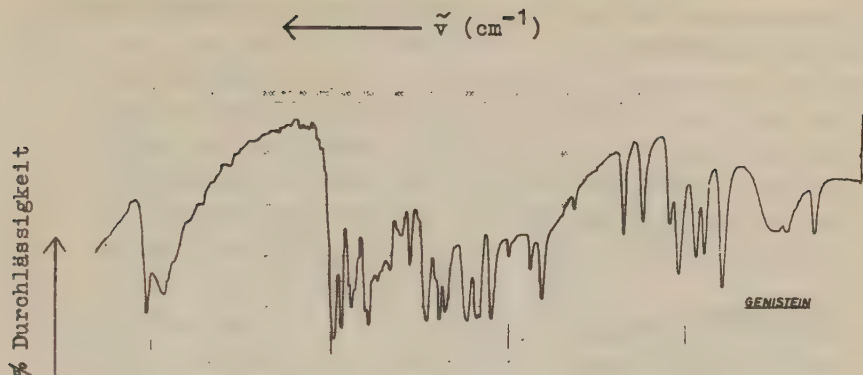


Abb. 12
IR-Spektrum von auth. Genistein

Genistin und sein Aglukon Genistein sind bisher relativ wenig in Drogen nachgewiesen worden. Man wurde auf diese Verbindung aufmerksam, als man beim Verfüttern verschiedener Genistein-haltiger Leguminosen an Tieren eine oestrogene Wirkung beobachtete⁵¹⁾. In der Verfälschung des Besenginsters, in *Spartium junceum* (span.Ginster) ist Genistin nicht enthalten. Genistin ist erstmals von WALZ⁵²⁾ aus *Soja hispida* Moench isoliert worden. BRADBURY und WHITE⁵³⁾ gelang es, das Aglukon Genistein aus *Trifolium subterraneum* zu gewinnen. PERKIN und NEWBURY isolierten ebenfalls das Aglukon aus dem Färberginster⁵⁴⁾, und BAKER und ROBINSON⁵⁵⁾ wiesen nach, daß die als Prunetin von PINNEMORE⁵⁶⁾ aus der Rinde einer Prunusart gewonnene Verbindung mit Genistein identisch war. GRASMAIER isolierte Genistin aus *Lupinus polyphyllus* Lindl.⁵⁷⁾. Obwohl Literaturangaben von Genistin als Inhaltsstoff des Besenginsters berichten, war es bisher hieraus nicht isoliert worden. Durch unsere Arbeit ist nunmehr das Vorkommen von Genistein-monoglukosid auch im *Sarothamnus scoparius* gesichert.

51) J.D.BIGGERS u. D.H.CURNOW, *Biochem.J.* **58**, 278 (1954)

52) E.WALZ, *Liebigs Ann.Chem.* **489**, 118 (1931)

53) R.B.BRADBURY u. D.E.WHITE, *J.chem.Soc.(London)* **3447** (1951)

54) A.G.PERKIN u. P.G.NEWBURY, *J.chem.Soc.(London)* **75**, 830 (1899)

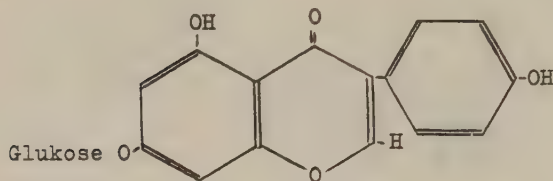
55) W.BAKER u. R.ROBINSON, *J.chem.Soc.(London)* **127**, 1981 (1925)

56) H.PINNEMORE, *Pharmac.J.* **31**, 604 (1910)

57) H.GRASMAIER, *Naturwiss.* **45/18**, 388 (1958)

Genistin, das Genistein-7-monoglukosid besitzt folgende Konstitution:

F o r m e l b i l d 3



G e n i s t i n

f) Identifizierung von Substanz F

Diese Verbindung gibt auf dem Papierchromatogramm eine blaue Fluoreszenz und schmilzt nach Umkristallisation aus Methanol/Wasser scharf bei 272°C . Sie sublimiert bei 250°C in Form feiner langer Nadeln. Damit war die Zugehörigkeit zur Stoffgruppe der organischen Säuren ausgeschlossen und die Möglichkeit, daß ein Cumarinderivat vorlag, gegeben.

Zur weiteren Charakterisierung führen wir nach SVENDSEN⁵⁸⁾ eine Sprühreaktion auf dem Papierchromatogramm durch. Wir benutzten dazu 1%ige äthanolische Kalilauge, trockneten das Chromatogramm bei 100°C und besprühten anschließend mit Diazoreagens. Substanz F färbte sich gelbrot und ließ damit freie Hydroxylgruppen im Molekül erwarten.

Wir azetylierten die Substanz mit Essigsäureanhydrid und Natriumazetat in bekannter Weise und erhielten ein Produkt vom Smp. = 133°C , das laut Elementaranalyse (32.82% CH_3CO) einem Diazetat entsprach.

Auf ein Dihydroxycumarin von der Formel $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4$ (178) bezogen entsprachen die gefundenen Elementaranalysenwerte (C 60.86 %, H 3.43 %) sehr gut den hierfür berechneten Daten.

58) A.B. SVENDSEN "Zur Chemie Norwegischer Umbelliferen" S. 36, Verlag Johan Grundt Tanum, Oslo (1954)

Die Messung des UV-Spektrums führte zu einem Kurvenverlauf, der durch drei Maxima bei 260 m μ , 300 m μ und 350 m μ gekennzeichnet war. Ähnliche Spektren findet man bei di- oder trisubstituierten Cumarinen⁵⁹⁾⁶⁰⁾⁶¹⁾. Das zum Vergleich herangezogene 7,6-Dihydroxycumarin Aesculetin gab mit unserer Substanz im Mischschmelzpunkt keine Depression. Papierchromatographisch lag es ebenfalls in mehreren Systemen ($\bar{A}AW = 0.8$, $BEW = 0.72$, $IAW = 0.67$) mit Aesculetin auf gleicher Höhe.

Nachdem Substanz F in den analytischen Werten mit Aesculetin übereinstimmte, führten wir zum endgültigen Beweis eine Überlagerungsaufnahme der Infrarotspektren durch. Wir konnten damit Substanz F eindeutig als das 6-7-Dihydroxycumarin Aesculetin identifizieren.

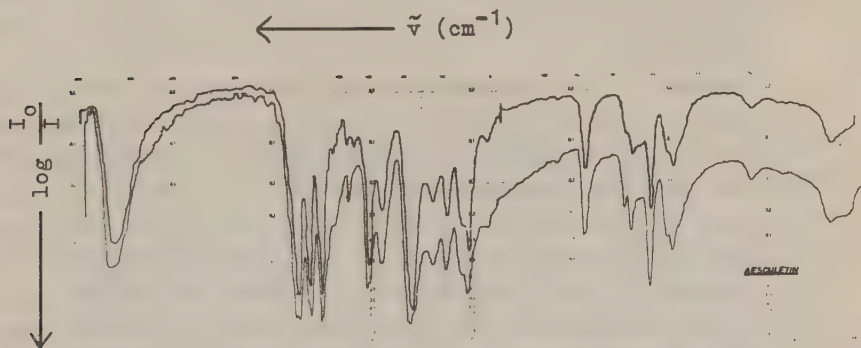


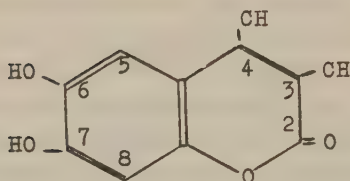
Abb. 13

Überlagerungsaufnahme der IR-Spektren von Substanz F und Aesculetin

Das aus *Sarothamnus scoparius* isolierte Cumarin besitzt folgende Konstitution:

-
- 59) E.STEINEGGER u. O.HAHN, *Sci.Pharm.* **21**, 254 (1953)
60) E.STEINEGGER u. A.BRANTSCHEN, *Sci.Pharm.* **27**, 3 (1959)
61) R.H.GOODWIN u. B.M.POLLOCK, *Arch.of Biochem.and Biophys.* **49**, 1 (1954)

Formelbild 4



Aesculetin

Aesculetin wurde erstmals als Spaltprodukt des Aesculins von MINOR⁶²⁾ in der Rinde von *Aesculus hippocastanum* aufgefunden. Außerdem findet es sich in den Wurzeln von *Gelsemium sempervirens* und in den Früchten von *Prunus spinosa*. Die Synthese des Aesculetins wurde von GATTERMANN und KÖBNER⁶³⁾ durchgeführt. NIETZKI⁶⁴⁾ isolierte aus den Blüten von *Cichorium intybus* ein Glykosid, das er unter der Bezeichnung Cichoriin in die Literatur einführte. MERZ⁶⁵⁾ stellte fest, daß Cichorigenin mit Aesculetin identisch ist. Bei seinen Untersuchungen über die Inhaltsstoffe des spanischen Ginsters (*Spartium junceum*) fand DHINGRA⁶⁶⁾ den gleichen blau fluoreszierenden Stoff in wesentlich stärkerer Konzentration als im Besenginster. Er konnte damals kein kristallines Produkt erhalten und identifizierte es auf Grund einfacher papierchromatographischer Untersuchungen als Kaffeesäure. Wir haben ebenfalls mit einem methanolischen Konzentrat der Blüten des spanischen Ginsters papierchromatographische Vergleich angestellt und gefunden, daß in der Droge nicht Kaffeesäure, sondern ebenfalls Aesculetin vorliegt. Die Kaffeesäure zeigt eine stärkere Blaufluoreszenz und liegt im R_f -Wert eindeutig tiefer.

62) M.MINOR, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 38, 130 (1831)

63) L.GATTERMANN u. M.KÖBNER, Ber.dtsch.Chem.Ges. 32, 287 (1899)

64) K.NIETZKI, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 208, 327 (1876)

65) K.W.MERZ, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 270, 476 (1932)

66) H.S.DHINGRA, Dissertation München (1957)

Inwieweit dies durch jahreszeitliche Unterschiede oder Standortverschiedenheiten bedingt ist, läßt sich nachträglich nicht mehr entscheiden, doch ist die Möglichkeit einer Umwandlung von Kaffeesäure in Aesculetin in der Pflanze nicht von der Hand zu weisen, nachdem erst kürzlich SUMERE⁶⁷⁾ und Mitarbeiter in Modellversuchen gezeigt haben, daß die Kaffeesäure bereits in wässriger Lösung an der Luft bei Gegenwart von Mangan II bzw. Eisen(III)-salzen zum Aesculetin zyklisiert wird.

g) Versuche zur Identifizierung von Substanz G

Aus den Fraktionen 1-5 der vereinigten Lösungen 1 - 53 konnten wir nach erneuter Verteilung an einer Perlonsäule nur 20 mg Substanz G gewinnen, so daß eine völlige Reinigung des Stoffes nicht gelang. Der Schmelzpunkt von 310°C gab Hinweis auf das Vorliegen eines Flavonaglukons.

Auch auf dem Papierchromatogramm lief die Substanz in ÄAW bis zum R_F-Wert 0.8, in BEW bis 0.76 und lag damit im Bereich der Aglukone. Im Hinblick auf die bisher in *Sarothamnus scoparius* aufgefundenen Substanzen kamen für einen Vergleich die Aglukone Luteolin, Quercetin und Apigenin in Frage. Wir chromatographierten diese Testsubstanzen zusammen mit unserem Stoff und fanden die beste Übereinstimmung mit Luteolin. Durch Behandlung mit basischem Bleiazetat wurde die zunächst dunkelbraun fluoreszierende Substanz orangegelb angefärbt. Diese Erscheinung geben Flavone mit einer o-Dihydroxygruppierung im Seitenphenyl.

Durch die Messung der UV-Maxima wurde unsere Vermutung bestätigt. Die gefundenen Maxima bei 350 mμ und 256 mμ entsprachen den Literaturangaben⁶⁸⁾⁶⁹⁾.

Der Versuch mit 5 mg Substanz eine Säurehydrolyse durchzuführen blieb ergebnislos. Nach Neutralisation und Ein-

67) C.F.VAN SUMERE, F.PARMENTIER u. M.VAN PORCHE, Naturwiss. 46, 668 (1959)

68) H.NAKAMURA, T.OHTA u. G.HUKUTI, J.Pharmacol.Soc.Japan 56, 107 (1936)

69) B.PURI u. T.R.SESHADRI, ref. Chem.Abstr. 44, 1977 (1950)

engen der Hydrolysenflüssigkeit war der Stoff wieder unverändert nachweisbar.

Die Elementaranalyse erbrachte wegen Verunreinigung der Substanz keine exakten Daten, die für Luteolin beweisend gewesen wären. Wir fanden CH-Werte von C % 61.17 und H % 3.87 gegenüber den geforderten Daten von 62.90 C % und 3.49 H %.

Da wir wegen Substanzmangel keine weiteren chemischen Untersuchungen anstellen konnten, zogen wir zum Vergleich noch das Infrarotspektrum heran. Wie aus den Abbildungen 13 und 14 hervorgeht, besteht Identität mit dem genannten Flavon.

Für das Vorliegen von Luteolin spricht außerdem, daß in der Droge Glykoside des Luteolins enthalten sind.

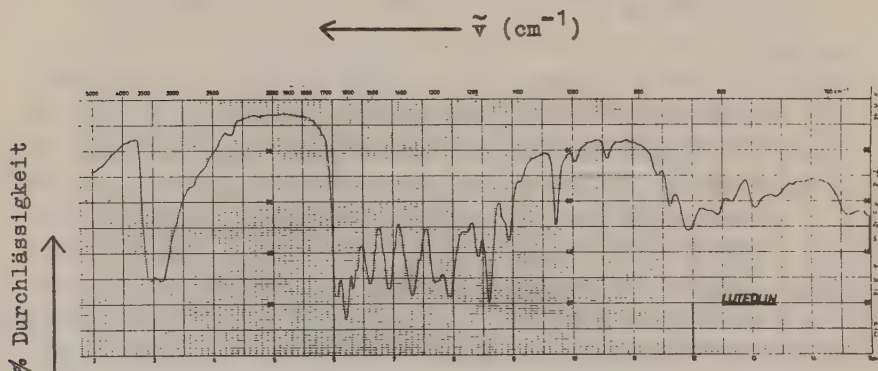


Abb. 13
IR-Spektrum von Substanz G

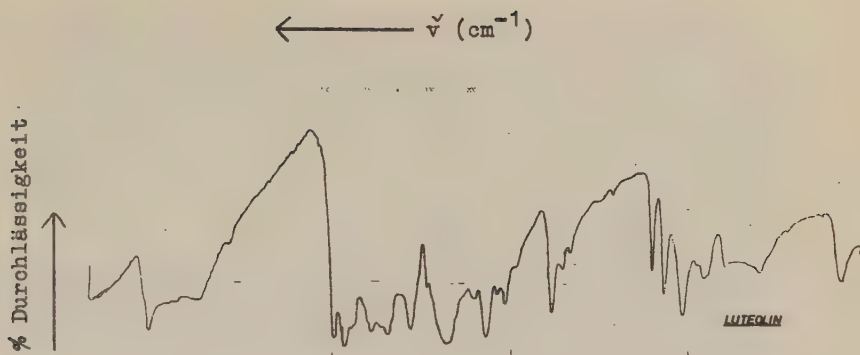


Abb. 14
IR-Spektrum von auth. Luteolin

h) Identifizierung von Substanz H

Aus den Blütenrückständen gewannen wir durch wiederholtes Ausziehen mit Methanol Substanz H in langen weißen Nadeln, die aus Methanol umkristallisiert einen Schmelzpunkt von 138°C aufwiesen. Sie waren gut löslich in Äther und Methanol, wenig löslich in Wasser.

Wir machten einen Sublimationsversuch mit Substanz H und fanden, daß die Verbindung bei normaler Temperatur um 125°C in Form feiner Nadeln sublimierte. Der Schmelzpunkt der Substanz erhöhte sich dann auf 143°C .

Weder auf Papierchromatogrammen, noch auf Polyamiddünnschichtplatten konnten wir unter dem UV-Licht Substanz H unbesprüht nachweisen. Erst die Chromatographie auf einer Kieselgelplatte in Chloroform führte nach dem Besprühen mit 10%iger meth. Natronlauge zu einem schwach fahlen Fleck in der Höhe des R_F -Wertes 0.6. Kaliumpermanganat, Stannuochlorid und Jod-Jodkalilösung gaben mit Substanz H keine Reaktion.

Die Elementaranalyse der Substanz ergab 62.09 % C und 4.88 % H. Eine Methoxylgruppenbestimmung führte zu 29.29 % OCH_3 . In Hinblick auf die leichte Sublimierbarkeit der

Substanz und seine gute Löslichkeit in Äther bezogen wir die Werte der Mikroanalyse auf ein zweifach methoxyliertes Cumarin von der Summenformel $C_{11}H_{12}O_4$ und dem Molekulargewicht 208. Die berechneten CH-Werte für diese Verbindung sind 63.41 % C und 5.07 % H. Während der OCH_3 -Wert von 29.07 mit dem gefundenen gut übereinstimmte, lag der Kohlenstoffwert um rund 2% zu tief.

Da dies auf einer Verunreinigung beruhen konnte, verglichen wir das UV-Spektrum von Substanz H mit Literaturspektren. Verfügbar waren die Spektren von Aesculetin, Scopoletin und Dimethoxyaesculetin.

Während unsere Verbindung nur ein Hauptmaxima bei 240 m μ und ein kleines bei 280 m μ besitzt, sind alle anderen in Frage kommenden Dimethoxycumarine durch ein Hauptmaximum zwischen 300 m μ bis 330 m μ und zwei weitere Maxima bei 260 m μ und 350 m μ ausgezeichnet. Seltsamerweise blieb das Normalspektrum von Substanz H auf Zusatz von n/10 KOH völlig unverändert, ein Befund, der gegen das Vorliegen eines normalen Cumarins sprach, da typische Cumarine unter diesen Bedingungen eine Ringöffnung zu einer o-Cumarsäure erleiden.

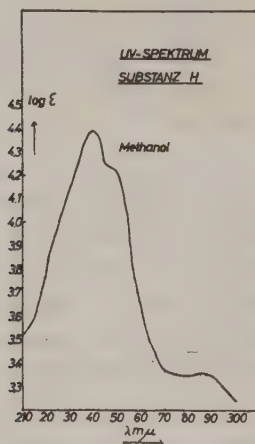
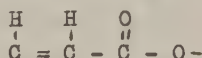


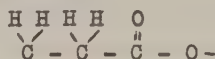
Abb. 15

UV-Spektrum von Substanz H

Da das für Cumarintypische Maximum zwischen 300 und 325 m μ auf die α - β -ungesättigte Laktongruppierung zurückgeht, lag die Vermutung nahe, daß ein teilweise hydrierter Laktonring vorliegen könnte. Eine derartige Veränderung wäre mit dem fast völligen Verschwinden des Maximums bei 300 m μ in Einklang zu bringen. Diese strukturelle Besonderheit mußte aber im IR-Spektrum deutlich werden. Wir verglichen daraufhin die IR-Spektren von Substanz H mit Aesculetin, Scopoletin und anderen α - β -ungesättigten Laktonen und fanden im Bereich von 1750 cm $^{-1}$ - 1550 cm $^{-1}$ einen auffallenden Unterschied zwischen unserer Substanz und den anderen Verbindungen. Substanz H hat seine C=O-Absorption bei 1720 cm $^{-1}$. Diese liegt bei Aesculetin bei Wellenzahl 1660 cm $^{-1}$, beim Scopoletin bei 1710 cm $^{-1}$. Die kurzwellige Lage der C=O-Bande in Substanz H könnte als Hinweis gelten, daß ein α - β -ungesättigtes Lakton vorliegt. Während Aesculetin und Scopoletin bei 1625 cm $^{-1}$ und 1570 cm $^{-1}$ die für die C=C-Gruppierung und den aromatischen Kern verantwortlichen Banden zeigen, fehlen beide im IR-Spektrum von Substanz H (siehe IR-Spektrum Abb. 16). Dieser Befund erklärt das abweichende UV-Spektrum, die schwache Fluoreszenz und die geringe Tendenz zur Laktonöffnung sehr gut. Demnach dürfte nicht die Gruppierung



sondern die Anordnung



vorliegen, und Substanz H wäre als ein Dimethoxy-3,4-dihydrocumarin anzusprechen.

Wenn man von der Voraussetzung ausgeht, daß die im Aesculetin vorliegende 6,7-Substitution auch dem Gerüst von Substanz H zugrunde liegt, müßte der Verbindung die Struktur eines 6,7-dimethoxy-3,4-dihydrocumarins, wie dies im Formelbild gezeigt ist (Formelbild 5), zukommen. Tatsächlich findet man in der Literatur⁷⁰⁾ für diese Verbindung ein UV-Spektrum, das dem unseren gleicht.

70) R.H.GOODWIN u. .POLLOCK, Arch.of Biochem and Biophys. 49, 1(1954)

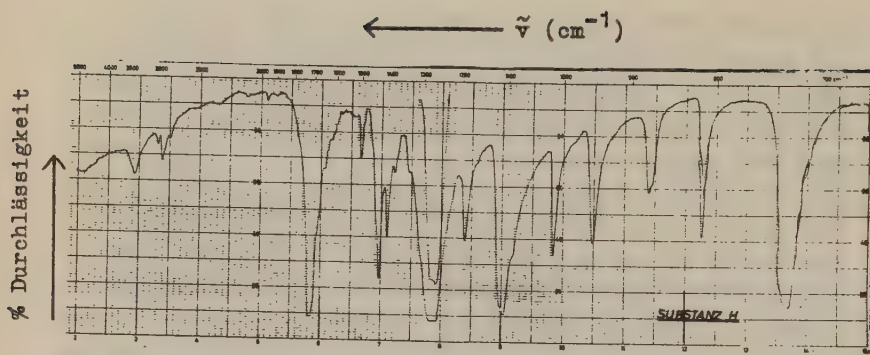
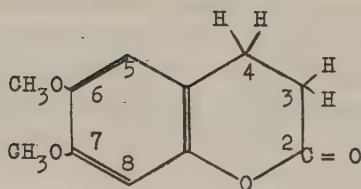


Abb. 16
IR-Spektrum von Substanz H

Formelbild 5



6,7-dimethoxy-3,4'-dihydrocumarin

IV. Zur Konstitution des Scoparins

a) Bisherige Untersuchungen

STENHOUSE isolierte im Jahre 1851 das Scoparin erstmals aus dem Besenginster und gab ihm die Summenformel $C_{21}H_{22}O_{11}$ ⁷¹⁾. GOLDSCHMIDT und HEMMELMAYR⁷²⁾⁷³⁾ setzten die Untersuchungen fort und beschrieben die Fähigkeit des Scoparins Hydrate zu bilden. Ihre Schmelzpunkte variierten zwischen 202° - 219°C. Es gelang ihnen aus dem Molekül eine Methoxygruppe abzuspalten und nach Alkalibehandlung Vanillinsäure nachzuweisen. Mit Mineralsäuren erreichten sie keine hydrolytische Spaltung. Sie sprachen dem Scoparin deshalb die glykosidische Natur ab und stellten die neue Formel $C_{20}H_{20}O_{10} \cdot 4.5 H_2O$ auf.

PERKIN⁷⁴⁾ beschäftigte sich ebenfalls mit Scoparin. Er wies auf die große Übereinstimmung mit dem eben aus Vitex littoralis gewonnenen Vitexin hin, das er damals noch für ein Luteolinderivat hielt. Er war der Meinung, daß Scoparin ein Methoxyvitexin sei, nachdem er in Unkenntnis der vordem erwähnten Arbeiten deutscher Autoren noch einmal die Anwesenheit einer Methoxygruppe ermittelte⁷⁵⁾. Perkin fand mehr Hydroxylgruppen als es einem normalen Flavonkörper entsprach und stellte die neue Summenformel $C_{22}H_{22}O_{11}$ auf.

HERZIG und TIRING⁷⁶⁾ gelang im Jahre 1918 eine erschöpfende Methylierung des Scoparins. Zu der bereits im Molekül vorhandenen OCH_3 -Gruppe waren noch weitere 7 OCH_3 -Gruppen hinzugekommen. Sie hielten die von Perkin aufgestellte Summenformel für wahrscheinlicher als die von Goldschmidt und Hemmelmayer. Die Autoren berichteten, daß Scoparin und seine Derivate leicht in den amorphen Zustand übergehen und kolloidale Lösungen bilden. Schmelzpunktsbestimmungen als Kriterium der Reinheit hielten sie deshalb für wenig beweiskräftig. Sie

71) J. STENHOUSE, Ann. der Chem. und Pharm. 78, 15 (1851)

72) G. GOLDSCHMIDT u. F. HEMMELMAYR, Mh. Chem. 14, 202 (1893)

73) G. GOLDSCHMIDT u. F. HEMMELMAYR, Mh. Chem. 15, 316 (1894)

74) A. G. PERKIN, J. chem. Soc. (London) 73, 1019 (1898)

75) A. G. PERKIN, J. chem. Soc. (London) 15, 123 (1899)

76) J. HERZIG u. G. TIRING, Mh. Chem. 39, 253 (1918)

fanden neben der $C_6C_3C_6$ -Einheit noch sechs C-Atome, die auf die Anwesenheit einer Hexose hindeuten könnten. Da auch sie mit Mineralsäuren keine Hydrolyse erreichten, lehnten sie für Scoparin eine Heterosidnatur ab. Physikalische Daten gaben sie nicht an.

HEMMELMAYR und STREHL⁷⁷⁾ beschäftigten sich im Jahre 1926 erneut mit dem Scoparin. Sie untersuchten das Produkt, das sie durch längeres Kochen mit Methanol erhielten und fanden für diesen Stoff einen Schmelzpunkt von $235^{\circ}C$. Sie bezeichneten ihn als ein Isomeres des Scoparins von der gleichen Summenformel. Der Körper konnte in der Ausgangslösung nicht mehr in Lösung gebracht werden. In alkalische Lösung gebracht fiel nach dem Ansäuern ein Niederschlag aus, der nach dem Umkristallisieren aus Äthylazetat wie Scoparin aussah. Dementsprechend zogen die Forscher den Schluß, daß sich Scoparin deshydratisiere und dabei zwei H_2O verlieren würde.

MASCRE und PARIS⁷⁸⁾ setzten die Untersuchungen am Scoparin 1937 fort. Sie berichteten, daß Scoparin beim Erhitzen auf $100^{\circ}C$ 7% seines Gewichtes verliert. Vor ihnen fand BOUILLLOT⁷⁹⁾ Scoparin würde im Vakuum bei $60^{\circ}C$ getrocknet, 7.22% seines Gewichtes verlieren. Entsprechend diesen Ergebnissen glaubten Mascre und Paris der Summenformel $C_{22}H_{22}O_{11}$ zwei H_2O hinzufügen zu müssen. Sie meinten, das Anhydrit würde leicht wieder Wasser aus der Luft aufnehmen, führten mit dem 2 Mol H_2O enthaltenden Produkt eine Verbrennung durch und kamen zu den in der Tabelle angeführten CH-Werten.

77) F. HEMMELMAYR u. J. STREHL, Mh. Chem. 47, 379 (1926)

78) M. MASCRE u. R. PARIS, Acad. Sc. 204, 1581 (1937)

79) J. BOUILLLOT, Journ. Pharm. et Chim. 23, 605 (1936)

T a b e l l e 1

Einwaage der Substanz mg	CO ₂	H ₂ O	C %	H %	O %
4.505	8.615	2.370	52.15	5.84	42.01
6.102	11.708	3.185	52.32	5.82	41.86
bezogen auf die Formel:					
C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁ + 2 H ₂ O			53.00	5.22	41.78

Die gleichen Autoren hielten Scoparin für einen Monomethyl-aether des Q u e r c e t i n s . Sie bestätigten durch Azetylierungsversuche, daß sieben Säurereste in das Molekül eingeführt werden können und stellten ein Kaliumderivat von der ungeführten Formel C₂₂H₁₅K₇ her. Beim Kochen mit 20%iger Schwefelsäure bemerkten sie das Auftreten von Methylfurfurol. Sie schlossen hieraus auf das Vorliegen einer Methylpentose. Auf Grund von Farbreaktionen mit Bials Reagens, Phloroglucin-Salzsäure, α-Naphthol-Schwefelsäure und β-Naphthol hielten sie Glukose als Zuckeranteil für unwahrscheinlich, glaubten aber Rhamnose annehmen zu müssen. Da sie nach fermentativer Spaltung und Behandlung des Hydrolysates mit Dinitrophenylhydrazin in geringer Menge ein Osazon isolieren konnten, das wie das Rhamnosazon unter Zersetzung schmolz, faßten sie ihre Ergebnisse in der folgenden Formel zusammen:



b) Eigene Untersuchungen

1. Schmelzpunkt und CH-Analyse

In den Fraktionen 45 - 53 der Polyamidchromatographie war Scoparin neben Glykosid A am stärksten angereichert. Wir konnten die beiden Substanzen nur durch erneute Verteilung an einer kurzen Perlonsäule auftrennen, wobei sich Scoparin etwas schneller aus der Säule ablösen ließ.

Aus den papierchromatographisch einheitlichen Stammlösungen des Scoparins fiel dieses nur teilweise kristallin aus. Die Hauptmenge schied sich als Gallerte ab, wie es schon von Goldschmidt und Hemmelmayr und den Autoren Herzig und Tiring beobachtet wurde. Wir glaubten lange, dieses Verhalten auf eine eventuelle Verunreinigung mit eingeschlossenen Pektinen zurückführen zu müssen. Nach Trocknung der gesammelten amorphen Ausfällungen in einer Trockenpistole lag Scoparin aber als hellgelbe körnige Masse vor. Es hatte 15% seines Gewichtes verloren. Wir lösten die Substanz durch Kochen am Rückfluß in Methanol, erreichten aber eine vollständige Lösung erst nach Zugabe von Wasser. Aus etwa 80% Methanol fiel Scoparin in langen strahlenförmigen Nadeln aus (siehe Abb. 17). Wir sammelten die Kristalle auf einer Mikronutsche und trockneten sie in einer Trockenpistole. Die Substanz zeigte einen Schmelzpunkt von 253°C . Alle früheren Autoren hatten mit ihrem Scoparin höchstens den Schmelzpunkt von 230°C erreicht. Wir müssen daher annehmen, daß diese Substanzen nicht völlig rein waren.

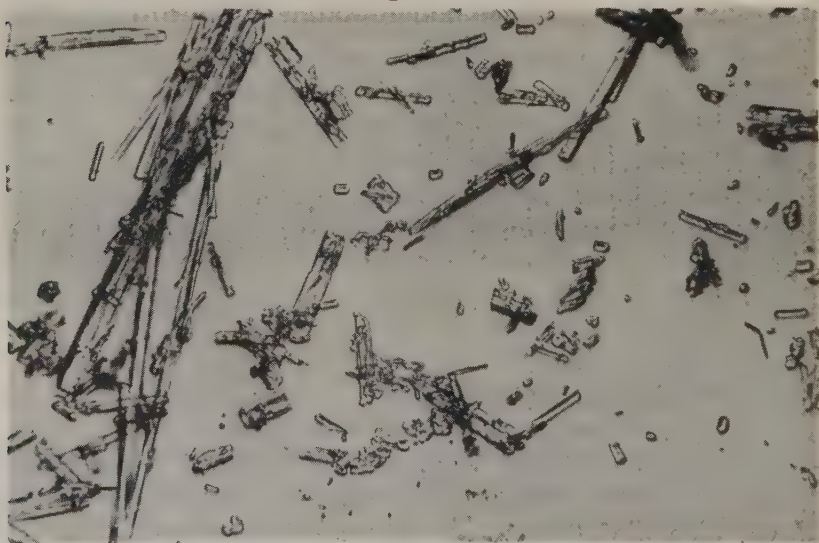


Abb. 17
Scoparinkristalle

Die mikroanalytischen Werte der Elementaranalyse bezogen wir auf die von Mascré und Paris angegebene Summenformel $C_{22}H_{22}O_{11} + 2 H_2O$. Wie aus der Gegenüberstellung (siehe Tabelle 2) hervorgeht, sind aber diese Werte mit der Summenformel nicht ganz in Einklang zu bringen. Unsere Werte entsprachen dagegen der von Perkin aufgestellten Summenformel $C_{22}H_{22}O_{11}$ ohne 2 Mol Wasser mit C % 57.14 und H % 4.76. Die aufgefundenen Daten sind 57.12 % C und 5.15 % H. Der Sauerstoff wurde von uns in einigen Fällen auch direkt bestimmt. Offenbar läßt sich durch Trocknen im Hochvakuum das gesamte Wasser beseitigen.

Auch unsere Methoxylgruppenbestimmung entspricht mit den berechneten Daten von 6.07% OCH_3 der Summenformel $C_{22}H_{22}O_{11}$, da wir einen Gehalt von 6.15% OCH_3 fanden. Dieser Wert steht im Einklang mit den Angaben früherer Autoren, die von der Anwesenheit eines Methoxyls im Molekül des Scoparins berichteten. In der folgenden Tabelle stellen wir unsere Analysenwerte noch einmal den Angaben der französischen Autoren MASCRÉ und PARIS⁸⁰⁾ gegenüber. Es geht daraus hervor, daß im Hochvakuum getrocknetes Scoparin keine zusätzliche Berücksichtigung von Kristallwasser etc. erforderlich macht, sondern ohne Wasser angegeben werden kann. Die Beobachtung der Autoren, daß Scoparin nach Trocknung wieder etwas Wasser aus der Luft aufnimmt, wird auch durch unsere Erfahrungen bestätigt, da wir immer geringe Abweichungen im Wasserstoffgehalt hatten.

80) M.MASCRÉ u. R.PARIS, Bull.sci.pharmacol. 44, 101 (1937)

T a b e l l e 2

Einwaage der Substanz mg	CO ₂	H ₂ O	C%	H%	O%	%OCH ₃	
berechnet auf die Summenformel <u>C₂₂H₂₂O₁₁ + 2 H₂O</u>							
nach Mascré und Paris	ber.	-	-	53.00	5.22	41.78	
4.505	gef.	8.615	2.370	52.15	5.84	42.01	
6.102	gef.	11.708	3.185	52.32	5.82	41.86	
berechnet auf die Summenformel <u>C₂₂H₂₂O₁₁ ohne H₂O</u>							
unser Ergebnis	ber.	-	-	57.14	4.76	38.09	6.07
3.956	1.gef.	8.28	1.28	57.12	5.15	-	6.15
3.874	2.gef.	8.07	1.77	56.85	5.11	-	-
4.606	3.gef.	9.57	2.06	56.70	5.00	-	-
2.635	4.gef.	-	-	-	-	37.74	-
2.935	5.gef.	-	-	-	-	37.61	-
berechnet auf die Summenformel <u>C₂₂H₂₂O₁₁ + 1 H₂O</u>							
		-	-	55.00	5.00	33.33	6.45
<u>+ 1/2 H₂O</u>							
		-	-	56.05	4.88	38.97	6.58

2. Azetylierung, Hydrolyseversuche und Entmethylierung

Die A z e t y l i e r u n g des Scoparins führte zu einem bei 240 - 241°C schmelzenden Produkt, dessen CH-Werte (C % 58.14; H % 4.90) gut auf ein Heptaazetat (ber. 57.14 % C; 4.76 % H) paßten. Frühere Autoren haben keine Schmelzpunktangaben gemacht. Unsere elementar-analytischen Werte entsprachen einem Multiplum von C₂H₂O und stehen damit im Einklang mit den Angaben der Autoren HERZIG und TIRING⁸¹⁾.

81) J.HERZIG u. G.TIRING, Mh.Chem. 39, 253 (1918)

Wir versuchten mit Salzsäure und Schwefelsäure erneut die Verbindung zu spalten um die Zuckerkomponente des Scoparins aufzufinden. Nur mit Kilianisäuremischung⁸²⁾ erhielten wir nach 10stündiger Einwirkung eine schwache Spaltung, da wir auf dem Papierchromatogramm neben unverändertem Scoparin noch einen zweiten Fleck in Höhe des R_F -Wertes von Luteolin beobachten konnten. Ein Zucker ließ sich papierchromatographisch nicht nachweisen. Diese schwere Hydrolysierbarkeit unserer Substanz gab auch hier wieder Anlaß, an das Vorliegen eines C-Glykosides zu denken, nachdem bereits Perkin auf die Ähnlichkeit mit Vitexin hingewiesen hatte und kürzlich EVANS und Mitarbeiter⁸³⁾ für das Vitexin die Struktur eines C-Glykosides bewiesen haben. Es bestand aber auch die Möglichkeit einer Beziehung zu der an unserem Institut erstmals aufgefundenen Glykosylverbindung Orientin, einem Luteolinanalogon des Vitexins, die wir auch im Besenginster gefunden hatten. Diese Vermutung stützte sich auf die Beobachtung, daß Luteolin nach Einwirkung von Kilianimixtur gebildet worden war.

Um die Grundstruktur des Scoparins festzulegen, hofften wir durch Entmethylierung zu einer Verbindung vom Typ des Vitexins oder Orientins oder gar zu einem von beiden zu gelangen. Der Entmethylierungsversuch mit Jodwasserstoffsäure führte, ohne daß ein kristallines Produkt zu fassen war, erneut zu Luteolin, das papierchromatographisch identifiziert wurde. Die Sprühreaktionen mit Bleiazetat waren mit denen der Testsubstanz identisch. Offenbar war durch Einwirkung von Jodwasserstoffsäure nicht nur das Methoxyl, sondern auch der Glykosylrest abgespalten worden. Für die Annahme eines hydroxylhaltigen Restes sprachen sowohl die Ergebnisse der Methylierung von Herzig und Tiring, die in das Molekül neben dem bereits vorhandenen einen Methoxyl sieben weitere einführen konnten und die geglückte Darstellung eines Heptaazetates. Auf Grund

82) H.KILIANI, Ber.dtsch.Chem.Ges. 63, 2866 (1936)

83) W.H.EVANS, A.McGOOKIN, L.JURD, A.ROBERTSON u. W.R.N.WILLIAMSON, J.chem.Soc.(London) 3510 (1957)

dieser Untersuchungen war das Vorliegen von Vitexin als Grundstruktur des Scoparins nicht mehr anzunehmen, da Vitexin wohl ein Heptaazetat liefert, aber kein Octamethylprodukt ergeben kann.

3. UV-Messungen (Normalspektren)

Zur Entscheidung, ob dem Scoparin eine Luteolin- bzw. Orientin- oder Apigenin- bzw. Vitexinstruktur zukommt, führten wir UV-spektrophotometrische Messungen aus. Wir fanden erneut bestätigt, daß Scoparin in seinen Maxima besser mit den für Luteolin und seinen Derivaten bekannten Werten übereinstimmt, als mit den Spektren des Apigenins oder des Quercetins. SCARZYNSKI⁸⁴⁾ fand bei seinen Untersuchungen, daß Normalspektren bei einer Zuckerverknüpfung am C-Atom 7 keine Abweichung in den Maxima erfahren, was nach unseren bisherigen Beobachtungen auch für Substitutionen am C-Atom 8 gilt. Wie aus den Daten der Tabelle ersichtlich ist, kann damit für das Scoparin eindeutig die Apigenin- oder Quercetinstruktur verneint werden.

84) B.SCARZYNSKI, Biochem.Z. 301, 150 (1939)

T a b e l l e 3

Flavon	Maxima in Methanol	
	Max ₁ mμ	Max ₂ mμ
Luteolin	350	257
Luteolin-4'-glukosid	335	270
Orientin aus <i>Spartium junceum</i>	351	258
Orientin aus <i>Sarothamnus scoparius</i>	351	257
Scoparin	345	270
Apigenin-4'-methylläther	328	276
Quercetin	370	256
Quercetin-4'-glukosid	366	254
Vitexin auth.	332	270

4. UV-Spektren in Natriumazetatmilieu

Bei Flavonen gibt sich eine freie C₇-OH-Gruppe auf Na-Azetatzusatz durch eine starke Verschiebung⁸⁵⁾ namentlich des langwelligen Maximums zu erkennen. Man kann daher diese Eigenschaft zur Klärung heranziehen, ob diese frei oder verglykosidiert ist. Wir fanden beim Scoparin eine Verschiebung des ersten Maximums um +40. Sie liegt in der Größenordnung wie beim Orientin (+28) und Luteolin (+16). Hieraus geht hervor, daß keine Verglykosidierung am C₇ besteht.

85) T.A.GEISSMAN u. U.KRANEN-FIEDLER, Naturwiss. 43, 226 (1956)

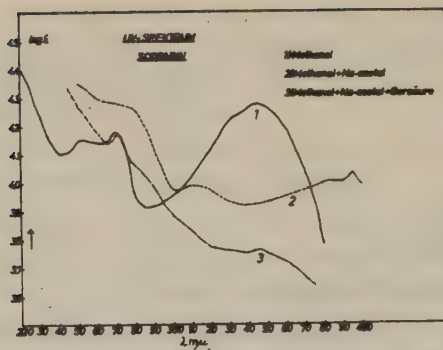


Abb. 18
UV-Spektrum von Scoparin

5. Farbreaktionen auf dem Papierchromatogramm

Weiteren Einblick in die Substitutionsverhältnisse im Molekül des Scoparins suchten wir durch Sprühreaktionen auf dem Papierchromatogramm zu gewinnen. Scoparin zeigt nach dem Besprühen mit basischem Bleiazetat eine etwas abweichende Farbgebung als sie Luteolinderivaten im allgemeinen entspricht. Unter UV-Licht betrachtet ist der Scoparinfleck grüngelb gefärbt und steht damit im Gegensatz zu dem orangegelben Fleck des Luteolinsderivates Orientin. Da eine Orangefärbung für eine Dihydroxygruppierung der Luteolinderivate im Seitenphenyl typisch ist, könnte die Anwesenheit der im Scoparin enthaltenen Methoxylgruppe den Farbunterschied bewirken. Mit Aluminiumchlorid behandelt erfahren die Flavonflecke des Scoparins und Orientins keine abweichende Farbänderung. Sie fluoreszieren beide gelb.

Einen wichtigen Hinweis für die Substitutionsverhältnisse erhielten wir durch den Zirkon-Zitronensäure-Test. Mit Zirkonoxychlorid besprüht fluoreszierte Scoparin zunächst gelb. Diese Farbe ließ sich durch anschließende Behandlung mit Zitronensäure löschen und durch Einwirkung von Salzsäure nicht rückgängig machen. Damit ist

eine Zuckersubstitution am C-Atom 5 ausgeschlossen und eine freie OH-Gruppe am C-Atom 5 bewiesen. Damit verbleiben für die OCH_3 -Gruppe praktisch nur noch C_3 - oder C-Atom 4'.

6. Alkaliabbau

Wir führten daher einen Alkaliabbau mit 25%iger wässriger Kalilauge durch und fanden dabei die Spaltprodukte Phloroglucin und Vanillinsäure. Vanillinsäure konnten wir in kristalliner Form gewinnen und durch Elementaranalyse, papierchromatographische Vergleiche und durch das IR-Spektrum (siehe Abb. 18) eindeutig identifizieren. Das Auftreten von Phloroglucin beweist noch einmal das Ergebnis unseres Zirkon-Testes und damit ein freies Hydroxyl am C-Atom 5. Die Vanillinsäure erklärt durch die Stellung des Methoxyls am C-Atom 3' die unterschiedliche Farbgebung beim Besprühen mit basischem Bleiazetat auf dem Papierchromatogramm, wie sie Luteolinderivaten mit freier Dihydroxylgruppierung im Seitenphenyl im allgemeinen nicht entspricht.

7. IR-Spektren

Letzter Hinweis für die postulierte Orientinstruktur war der Vergleich der IR-Spektren dieser Verbindungen. Wir fanden gute Übereinstimmung der Banden im Gebiet der CO-Valenzabsorption. Die C=O-Bande des Scoparins liegt wie bei Orientin und Vitexin bei der Wellenzahl 1657 cm^{-1} . Diese Position findet sich bei allen Flavonen mit freier Hydroxylgruppe am C-Atom 5. Über die Disubstitution im Seitenphenyl geben die Banden zwischen 900 cm^{-1} und 670 cm^{-1} Auskunft. Scoparin hat in diesem Bereich eine verhältnismäßig starke Bande bei 844 cm^{-1} , eine schwächere bei 790 cm^{-1} und eine weitere schwache Bande bei 755 cm^{-1} , wie sie einem di- oder trisubstituierten Flavon entspricht, während beim Vitexin nur eine starke Bande im Bereich um 835 cm^{-1} auftritt. In den C-O-Valenzschwingungen der Zucker zwischen 1000 cm^{-1} und 1130 cm^{-1} besteht gute Übereinstimmung zwischen Vitexin, Orientin

und Scoparin. Das deutet darauf hin, daß der hydroxyhaltige Rest aller drei Verbindungen ähnlich oder gleich gebaut sein muß. Die Entscheidung darüber, ob der Glykosylrest in der Ringform, oder wie beim Saponaretin oder Homo-Orientation als Kette vorliegt, läßt sich durch das IR-Spektrum nicht entscheiden, doch sprechen die CH-Werte eindeutig für ringförmige Anordnung.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Zuordnung des Scoparins zu den Flavonkörpern mit freiem C-Atom 5 und mehrfach substituiertem Seitenphenyl bei einer gewissen Ähnlichkeit mit Vitexin und vor allem mit Orientin durch das IR-Spektrum wesentlich unterstützt wird.

8. Perjodsäureoxydation

Um weiteren Einblick in die Zuckerkomponente des Scoparins zu erhalten, haben wir⁸⁶⁾ eine Perjodsäureoxydation durchgeführt. Nach HOUBEN und WEYL⁸⁷⁾ entstehen bei der Einwirkung von Perjodsäure auf Polyalkohole Ameisensäure und Formaldehyd, und zwar aus einem Mol Fructose oder Sorbose je 3 Mol Ameisensäure, aus 1 Mol Ribose, Arabinose, Xylose oder Rhamnose je 4 Mol Ameisensäure und aus Glukose, Mannose oder Galaktose je 5 Mol Ameisensäure.

Die Titrations führten zu einer Ausbeute von rund 4 Mol Ameisensäure, ein Ergebnis, das wir unabhängig davon auch beim Vitexin und Orientin erhalten haben. Obwohl diese Versuche keine Klarheit darüber bringen konnten, ob ein Pentosyl- oder Hexosylrest vorgelegen hat, zeigte doch der Vergleich mit den in der Struktur bekannten Verbindungen, daß beim Scoparin mit einer ähnlichen oder gleichen Hydroxylanordnung im $(C_6H_{11}O_5)$ -Rest zu rechnen ist.

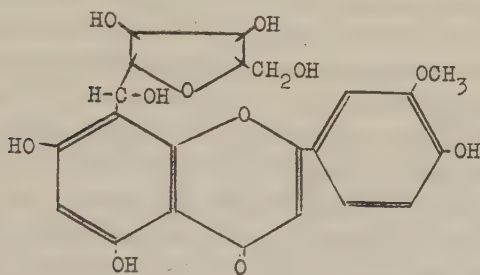
Vorbehaltlich der noch ausstehenden Darstellung des 8-Formyllderivates nach Totalmethylierung des Scoparins

86) A.SACHS, Dissertation München in Vorbereitung

87) J.HOUBEN u. TH.WEYL, "Methoden der organischen Chemie", Verlag G.Thieme, Stuttgart, Bd. 2, 360 (1953)

als schlüssigen Beweis für eine Verknüpfung am C-Atom 8
kann damit für Scoparin mit großer Wahrscheinlichkeit
die folgende Struktur angenommen werden.

Formelbild 6



Scoparin

Experimenteller Teil

1. Methodische Einzelheiten zur Anreicherung und Trennung der Substanzen an Polyamidsäulen.

a) Bereitung des wässrigen Extraktes

Etwa 11 kg frisch gesammelte Besenginsterblüten zogen wir in Anteilen von jeweils 300 - 500 g im Soxhlet mit 90%igem Methanol bis zur Farblosigkeit aus. Diese Arbeiten nahmen eine Woche in Anspruch. Das Methanol entfernten wir durch Destillation und nahmen den Rückstand mit etwa 2 l heißen Wassers auf. Zur Vertreibung des restlichen Methanols kochten wir den wässrigen Extrakt kurze Zeit in einer Porzellanschüssel und rührten dabei häufig mit dem Glasstab durch. Während des Erkaltsens setzte sich über Nacht das Chlorophyll an der Oberfläche ab, so daß es leicht entfernt werden konnte. Alle übrigen Ballaststoffe hatten sich auf dem Boden des Gefäßes zu einem dicken Brei angesammelt. Wir trennten sie in einer Zentrifuge von der Stammlösung, schlämmten den Rückstand mehrmals mit Wasser auf und zentrifugierten erneut. Dadurch lösten wir die noch eingeschlossenen Flavone aus dem schlammigen Rückstand. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt, die Rückstände nach papierchromatographischer Prüfung verworfen.

Nach dem gleichen Verfahren bereiteten wir Extrakte der Stengelteile des Besenginsters.

Weitere Reinigungsversuche der klaren braunen Stammlösung mit Chloroform oder Petroläther waren wegen Emulsionsbildung erfolglos.

b) Herstellung der Mischkristallisate

Wir brachten den wässrigen Extrakt auf ein Volumen von etwa 2 l, perforierten in einem Perforator von 2 l Fassungsvermögen mit 800 ml Äther und anschließend mit 1000 ml Äthylazetat. Dabei wechselten wir den Kolben häufig und beendeten jeden Arbeitsgang, wenn die organische Phase farblos ablief. Da die Äther- bzw. Äthylazetatextrakte reichlich Wasser und damit noch Verunreinigungen enthielten, brachten wir die Auszüge erneut zur Trockne, nahmen den Rückstand wieder mit heißem Was-

ser auf und perforierten nach dem Erkalten ein zweites Mal erschöpfend mit den organischen Lösungsmitteln. Die vereinigten Äther- bzw. Äthylazetatfraktionen trockneten wir mit Natriumsulfat und engten dann auf dem Dampfbad unter vermindertem Druck bis zur Trockne ein. Nach diesem Arbeitsgang lagen hellbraune pulverartige Mischkristallisate vor.

c) Auftrennung der Mischkristallisate an Perlonsäulen und Reinigung der Substanzen

Das durch Perforation mit Äther bzw. Äthylazetat erhaltene Mischkristallisat lösten wir in etwa 30 ml Methanol und brachten es auf eine vorbereitete Ultramidssäule. Wir verwendeten eine Chromatographiersäule von 6 cm lichter Weite und einer Höhe von 1.30 m. Die Füllhöhe betrug 1.10 m. Wir bereiteten die Säule vor, indem wir den unteren Teil mit angefeuchteter Watte und einer Siebplatte abschlossen und das Gerät anschließend mit einer dünnen Suspension von Ultramidpulver beschickten, das 24 Std. zuvor in 90%igem Methanol angeschlämmt worden war. Es wurde Polyamidpulver der Badischen Anilin- und Sodafabrik K.G., Ludwigshafen/Rhein verwendet, das unter der Bezeichnung Ultramidpulver K 228 BM 2 im Handel ist. Anschließend eluierten wir mit 90%igem Methanol bei Zimmertemperatur und einer Tropfgeschwindigkeit von 25 Tropfen/Minute.

Das Wandern der Substanz F konnten wir als vorauslaufende blaue Zone unter UV-Licht beobachten. Die Glykoside A, B, C, D, E und G bildeten eine einheitliche nicht unterteilte dunkelbraune Zone. Erst nach etwa 40 Fraktionen á 100 ml war zu erkennen, daß die später als Substanz A isolierte Verbindung weit hinter den übrigen Glykosiden zurückblieb, so daß wir mit den letzten Eluatn fast nur noch reines Glykosid A aus der Säule herauslösen konnten. Zunächst eluierten wir in Anteilen von 100 ml solange, bis reines Methanol die Säule verließ.

Isolierung von Substanz F

Die ersten 18 Fraktionen aus der Säule waren dunkelbraun gefärbt. Sie enthielten sehr viel Gerbstoffe und andere kristallisationsverhindernde Substanzen. Papierchromatographisch

konnten wir in den Fraktionen einen hohen Gehalt an Substanz F feststellen. Wir vereinigten die Lösungen, engten sie auf dem Wasserbad durch Destillation auf etwa 50 ml ein und stellten zur Kristallisation auf. Auch nach Tagen war die konzentrierte Lösung noch unverändert. Wir setzten 15 ml Wasser zu der methanolischen Lösung und beobachteten, wie sich die Flüssigkeit in zwei Phasen trennte. Am Boden des Gefäßes hatten sich braune, schmierige und klebrige Massen angesammelt. Die überstehende Flüssigkeit war trüb gelbbraun gefärbt. Wir trennten die Phasen durch Dekantieren und chromatographierten in ÄAW. In beiden Lösungen war Substanz F nachweisbar. Zur weiteren Reinigung befreiten wir die gelbbraune Flüssigkeit im Vakuum vom Wasser, nahmen den Rückstand in 50 ml Methanol auf und brachten diese Lösung zum Zwecke weiterer Reinigung auf eine kurze Perlonsäule von 30 cm Länge und eluierten mit 90%igem Methanol bei ganz geringer Tropfgeschwindigkeit. Auch diesmal fraktionierten wir in Anteilen von etwa 50 ml und prüften papierchromatographisch den Gehalt. Von den 15 Fraktionen waren die ersten vier Eluate wieder dunkelbraun, die restlichen Lösungen gelbbraun gefärbt. Alle enthielten sie Substanz F. Wir vereinigten aber nur die hell gefärbten Fraktionen, konzentrierten diese und stellten zur Kristallisation auf. Nach wenigen Tagen war Substanz F in langen Nadeln ausgefallen. Wir sammelten das Kristallisat auf einer Mikronutsche, wuschen mit wenig eiskaltem Methanol die restliche Mutterlauge aus und trockneten bei 60° C. Wir gewannen 460 mg Substanz F. Die Kristalle waren noch sehr unrein, so daß wir sie am Rückfluß mit der zum Lösen notwendigen Menge Methanol versetzten, eine Messerspitze Kohlepulver zugaben, etwa 2 Minuten weiterkochten und zwei Mal durch ein Hartfilter filtrierten. Die konzentrierte methanolische Lösung impften wir durch Reiben mit einem Glasstab bis zur Trübung. Über Nacht fielen aus der Lösung 350 mg rein weiße Kristalle aus, die bei 263° C schmolzen. Wir brachten die Substanz in einen Mikrosublimationsapparat aus Glas, der mit einem kleinen Kühler versehen war und sublimierten Substanz F. An der Kühlfläche sammelten sich lange weiße Nadeln. Sie waren noch weitaus größer und mit 272° C schmelz-

punktsrein.

Isolierung von Substanz E

Die Stammlösung von Substanz F chromatographierten wir und fanden, daß Substanz E als Unterlagerung die gleiche Laufhöhe in ÄAW besitzt. Wir hatten schon zuvor beobachtet, daß der blau fluoreszierende Chromatogrammfleck der Cumarinverbindung nicht ganz einheitlich war. Glykosid E fluoreszierte auf dem Chromatogramm dunkel und färbte sich nach einem Tag rötlich. Über diesem Fleck war noch schwach dunkel fluoreszierend Substanz G nachweisbar. Da in den Fraktionen 19 - 37 Glykosid E vermehrt auftrat, aber auch die Substanzen D, C und etwa B enthalten waren, vereinigten wir die Stammlösung von Substanz F mit diesen Fraktionen und engten die Flüssigkeit stark ein. Auf Grund des Unterschiedes in den R_F -Werten hofften wir, das Glykosid E durch Verteilung an einer kurzen Perlonsäule von 60 cm Höhe von den übrigen Substanzen abtrennen zu können. Wir fingen wieder 30 Fraktionen in Anteilen von etwa 50 ml auf und konnten durch Chromatographie in den ersten sieben Eluatn die Glykoside E und D nachweisen. Die Flüssigkeiten vereinigten wir, engten stark ein und stellten zur Kristallisation auf. Nach einigen Tagen schwammen auf der Oberfläche der Lösung feine farblose Blättchen. Diese sammelten wir auf einer Mikronutsche, wuschen mit Methanol und kristallisierten nach dem schon oben erwähnten Verfahren um. Glykosid E erhielten wir auf diese Weise als seidig weiß schimmernde Blättchen in einer Ausbeute von 300 mg. Der Schmelzpunkt lag bei 251° C.

Isolierung von Substanz G und D

Um auch die Stoffe G, D und C in entsprechender Konzentration zu erhalten, mußten wir die restliche Lösung der Fraktionen 1 - 37 auf ein Volumen von etwa 50 ml eingeeengt nochmals an einer Säule von 60 cm Höhe verteilen. In den ersten 7 Eluatn ließ sich Substanz G neben wenig Glykosid D nachweisen. Wir legten die Fraktionen zusammen, konzentrierten in der angegebenen Weise und stellten zur Kristallisation auf. Nach vier Tagen hatte sich am Boden Substanz G abgeschieden. Wir sammelten den Ausfall auf einer Mikronutsche und wuschen mit Me-

thanol. Da nur 20 mg Substanz G angefallen waren, unterließen wir es, diese noch einmal umzukristallisieren.

Aus den Fraktionen 8 - 12 und der restlichen Stammlösung der ersten sieben Eluate konnten wir nach Konzentration und längerem Stehen 60 mg Substanz D gewinnen. Die Substanz wurde in oben erwähnter Weise umkristallisiert und zeigte danach einen Schmelzpunkt von 229° C.

Isolierung von Glykosid A

Die Fraktionen wurden nunmehr auch dünnschichtchromatographisch untersucht. Als Adsorbens verwendeten wir Polyamid. Die Präparation erfolgte nach einem an unserem Institut entwickelten Verfahren⁸⁸⁾. Das Ausgangsprodukt stellt ein grobes Industrieperlon (Durethan BK 31 F) dar, das durch Lösen in konz. Salzsäure, anschließendem Verdünnen mit Methanol und Fällung durch Zugabe von Wasser unter ständigem Umrühren zu einer ganz feinen Suspension umgefällt wurde. Das auf diese Weise erhaltene feinkörnige Ultramid wurde auf einer Filternutsche gesammelt, von Resten der Salzsäure durch Waschen mit Wasser befreit und mit destilliertem Wasser suspendiert vorrätig gehalten. Als Träger der Schicht benutzten wir Glasplatten von 12 x 12 cm Fläche. Diese silikonisierten wir mit Silikonölemulsion BAYER H nach der von der Firma angegebenen Vorschrift. Einen Teil der Perlonsuspension befreiten wir vom Wasser, wuschen mit Methanol nach, bis beim Absaugen auf der Filternutsche keine Flüssigkeit mehr den Nutschenhals verließ und suspendierten die Substanz sofort mit Äthylazetat. Die neue Suspension gossen wir nun durch ein Sieb auf die Glasplatten und verteilten durch Neigen der Platten die Suspension zu einer gleichmäßigen Schicht, die nach wenigen Minuten verwendungsfähig war. Diese Art der Chromatographie hat den Vorteil einer sehr kurzen Laufzeit. Als Lösungsmittelsystem verwendeten wir Methanol/Eisessig/Wasser (90+5+5). Die Laufzeit betrug 20 Minuten. Der Zellosechromatographie war dieses Verfahren überlegen, da sich außerdem auf Grund der erreichten Trennung auf der Platte voraussagen läßt, wie sich die Stoffe in der Chromatographiersäule in etwa verteilen werden und welche Substanz in den nächsten Fraktionen zu erwarten ist.

88) K.H.RÖSLER, Dissertation München (1960)

Die Glykoside B und A aus den Fraktionen 45 - 53 und den restlichen Eluaten vorangegangener Aufarbeitungen waren durch einfache Kristallisation nicht zu trennen. Wir gaben daher die in etwa 30 ml Methanol gelöste Mischung über eine Perlonsäule mit einem Durchmesser von 2 cm lichter Weite und einer Füllhöhe von 50 cm. Durch diese Säule war es möglich, einheitliche Fraktionen von beiden Substanzen zu erhalten. Die Kristallisation des Glykosids A machte keine Schwierigkeiten. Die Reinigung erfolgte durch einfaches Kochen in Methanol am Rückfluß mit einer geringen Menge Lösungsmittel. Die Löslichkeit der Substanz in Methanol war gering, während die Verunreinigungen schnell in Lösung gingen, bevor ein zu großer Substanzverlust des Stoffes A eintrat. Dabei machten wir die Beobachtung, daß Glykosid A, wenn man es mit viel Methanol am Rückfluß nach langer Zeit in Lösung bringen konnte, auch nach stärkstem Einengen nicht mehr ausfiel. Es dauerte in einem solchen Fall etwa eine Woche, bis der Stoff durch Verdunsten des Lösungsmittels, allerdings in nicht kristallinem Zustand, zurückgewonnen werden konnte. In einem solchen Fall mußte Substanz A in etwa 50% Methanol erneut gelöst werden. Wir konnten Substanz A in einer Ausbeute von 230 mg und einem Schmelzpunkt von 265 - 267° C erhalten.

Isolierung von Glykosid B

Sehr große Schwierigkeiten bereitete die Herstellung des kristallinen Glykosids B. Obwohl frühere Autoren von der oftmals gelatinösen Beschaffenheit dieser Substanz berichteten, haben wir lange Zeit derartige Ausfälle des Glykosids verworfen. Wir stellten zwar papierchromatographisch fest, daß in diesem viel Substanz enthalten ist, dachten aber, in Pektin eingeschlossenes Glykosid vor uns zu haben, das auf keinem Wege schonend herausgelöst werden kann. Substanz B bildete beim Auskristallisieren aus einer viel Wasser enthaltenden Lösungen weiße schleimige Massen. Daneben traten aber auch sehr gute langnadelige strahlenförmige Kristalle auf, die jedoch mengenmäßig in keinem Verhältnis zu dem übrigen Ausfall standen. Da die Kristalle sehr groß waren und bei Umkristallisierungsversuchen immer wieder in teils schleimiger, teils kristalli-

ner Form anfielen, schien die Substanz noch stark verunreinigt. Nach vielen Versuchen erhielten wir Glykosid B in folgender Weise. Das aus sämtlichen Scoparin-haltigen Fraktionen erhaltene Scoparinhydrat sammelten wir auf einer Filternutsche von 6 cm Durchmesser. Die Fällungen waren so voluminös, daß wir eine sehr gute Ausbeute von Substanz B erwarteten. Wir trockneten die Massen unter einer Infrarotlampe vor, wobei das Volumen sehr stark abnahm und die Substanz hellgelbe trockene krümlige Beschaffenheit annahm. Diese brachten wir in eine Trockenpistole und trockneten sie im Vakuum mehrere Tage lang. Nun brachten wir die Substanz in einem Rundkolben mit Azeton in Lösung, indem wir auf dem Dampfbad kochten und gerade so viel Wasser zugaben, als zur Lösung am Rückfluß notwendig war. Aus etwa 80% Azeton - Wasser gewannen wir 500 g Scoparin, das einen Schmelzpunkt von 253° zeigte, nachdem wir es in einer Trockenpistole im Vakuum einen Tag lang getrocknet hatten. Diese Kristalle waren am Rückfluß mit Methanol gekocht kaum noch in Lösung zu bringen.

Isolierung von Substanz H

Diese Substanz gewannen wir nicht durch Verteilung an Perlon-säulen, sondern aus den Blütenrückständen der Soxhletextraktion. Wir bemerkten nach dem Dekantieren des Methanols, daß nach dem Trocknen der Blütenrückstände in diesen noch weiße Kristalle ausgefallen waren. Deshalb zogen wir die Rückstände noch einmal mit 90%igem Methanol aus und filtrierten die Lösung noch heiß durch ein Faltenfilter. Während der Filtration fielen bereits im Trichterhals lange weiße Kristalle aus, so daß wir den Vorgang mehrmals unterbrechen mußten, um die Substanz zu entfernen. Auf diese Weise gewannen wir 150 mg Substanz H von einem Schmelzpunkt von 138°C . Die Kristalle waren noch unrein, weshalb wir sie am Rückfluß mit der zum Lösen gerade notwendigen Menge Methanols kochten, etwas Kohlepulver zusetzten, und nach zwei Minuten weiteren Kochens zweimal durch ein Hartfilter filtrierten. Die ausgefallenen Kristalle zeigten nun einen Schmelzpunkt von 142°C . Später, als wir den Cumarincharakter der Substanz erkannt hatten, sublimierten wir diese noch wie oben beschrieben in einem Mikrosublimationsgerät und erhielten Kristalle von einem Schmelzpunkt von 143°C .

2. Papierchromatographische Untersuchungen

a) R_F-Werte

Die papierchromatographischen Untersuchungen wurden vorwiegend mit ungewaschenen Papieren Nr. 2043b G1 der Firma Schleicher u. Schüll ausgeführt. Chromatographiert wurde bei Zimmertemperatur in großen Glaskammern nach der absteigenden Methode in den Lösungsmittelsystemen Äthylazetat/Ameisensäure/Wasser (10+2+3), Butanol/Eisessig/Wasser (4+1+5) und Isopropanol/Ameisensäure/Wasser (2+5+5). Die R_F-Werte haben wir auf mehreren Chromatogrammen gemessen und deren Mittelwerte nachstehend tabellarisch zusammengestellt. Wir benutzten zur Chromatographie nur methanolische Lösungen der Mischkristallisate, da nicht vorgereinigte Extraktionen aus den Drogenteilen starke Schwanzbildung zeigten. Die aufgetragene Menge betrug durchschnittlich 0.3 ml.

T a b e l l e 4
R_F-Werte der Glykoside

Substanz	ÄAW (10+2+3)	BEW (4+1+5)	IAW (2+5+5)
Glykosid A	0.23	0.20	0.27
Orientin	0.23	0.20	0.27
Glykosid B	0.28	0.26	0.29
Scoparin	0.28	0.26	0.29
Glykosid C	0.33	0.38	0.43
Vitexin	0.33	0.38	0.43
Glykosid D	0.51	0.47	0.54
Hyperosid	0.51	0.47	0.54
Glykosid E	0.80	0.72	0.67
Aesculetin	0.80	0.72	0.67
Glykosid F	0.68	0.80	0.74
Genistin	0.68	0.80	0.74

Die Aglukone lösten wir in Methanol und trugen mit einer Mikropipette wie üblich 0.3 ml auf.

T a b e l l e 5
R_F-Werte der Aglukone

Substanz	ÄAW (10+2+3)	BEW (4+1+5)	IAW (2+5+5)
Genistein	0.85	0.93	0.62
Aglukon E	0.85	0.93	0.62
Aglukon D	0.78	0.65	0.18
Quercetin	0.78	0.65	0.18
Aglukon G	0.82	0.76	0.15
Luteolin	0.82	0.76	0.15

b) Fluoreszenzfarben im UV-Licht

Die Farbflecke auf den Chromatogrammen haben wir unter UV-Licht betrachtet, und zwar unbehandelt und nach dem Besprühen mit 5%iger wässriger Aluminiumsulfatlösung und einer basischen Bleiazetat-Lösung in der Konzentration des Liquor Plumbi subaceticici DAB 6. Die Farberscheinungen haben wir in nachstehender Tabelle zusammengefaßt.

T a b e l l e 6
Fluoreszenzfarben der Glykoside im UV-Licht

Substanz	unbesprüht	mit Aluminiumsulfat	mit bas.Bleiazetat
Glykosid A	braun	gelb	orange
Glykosid B	braun	gelb	gelbgrün
Glykosid C	braun	gelb	gelbgrün
Glykosid D	braun	gelb	gelbgrün
Glykosid E	rot	-	-
Glykosid F	blau	-	-
Orientin	braun	gelb	orange
Scoparin	braun	gelb	gelbgrün
Vitexin	braun	gelbgrün	gelbgrün
Hyperosid	braun	gelbgrün	orange
Aesculetin	blau	keine Veränderung	-
Genistin	rot	-	-

T a b e l l e 7
Fluoreszenzfarben der Aglukone im UV-Licht

Substanz	unbesprüht	mit Aluminiumsulfat	mit bas.Bleiazetat
Aglukon G	braun	gelb	orange
Aglukon D	grüngelb	grüngelb	orange gelb
Aglukon E	braun	-	-
Luteolin	braun	gelb	orange
Quercetin	grüngelb	grüngelb	orange gelb
Genistein	braun	-	-

3. Chemische Untersuchungen

a) Farbreaktionen

Reduktionstest nach WILLSTÄTTER⁸⁹⁾

Für die Durchführung des Reduktionstestes nach WILLSTÄTTER verweisen wir auf die Originalliteratur⁸⁹⁾ und auf ausführliche Arbeiten, die am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre in München durchgeführt wurden⁹⁰⁾⁹¹⁾⁹²⁾.

Molisch-Reaktion

Wir verwendeten 0.5 ml der methanolischen Lösung der Glykoside, versetzten sie mit 2 Tropfen einer 15%igen alkoholischen Lösung von α -Naphthol und unterschichteten die Mischung vorsichtig mit 1 ml konz. Schwefelsäure. Bei Vorliegen von Glykosiden entstand an der Berührungsfläche ein violettbrauner Ring. Beim Durchmischen der Flüssigkeiten nahm die Lösung eine dunkelrote Farbe an. Rutin und Quercetin wurden in jeden Fall zum Vergleich herangezogen.

Briggs- und Locker-Test zum Nachweis von freiem C₅-Hydroxyl⁹³⁾

1 ml der methanolischen Lösung der Glykoside und Aglukone versetzten wir mit 1 Tropfen einer 0.1%igen wässrigen Eisenschlo-

89) R.WILLSTÄTTER, H.MALLISON, S.B.preuss.Akad.Wiss.phys.math.Kl. 769 (1914)

90) L.STICH, Dissertation, München (1958)

91) F.GLOGGENIESSER, Dissertation, München (1958)

92) R.SEMRAU, Dissertation, München (1958)

93) L.H.BRIGGS u. R.H.LOCKER, J.Chem.Soc.(London) 3131 (1951)

ridtlösung. Die Lösungen färbten sich zunächst grün und dann unspezifisch braun an. Dann gaben wir 2 Tropfen verdünnter Salzsäure zu und neutralisierten wieder mit Natriumazetat. Die Neutralisation mit Natriumazetat war notwendig, da eine Reaktion mit Eisenchlorid nur in schwach saurem Milieu zu reinen Farbwerten führt.

Zirkon-Zitronensäure-Test

Bezüglich der Durchführung des Zirkon-Zitronensäure-Testes als Sprühtest und im Reagensglas verweisen wir auf die Originalliteratur⁹⁴⁾⁹⁵⁾ und auf Arbeiten, die am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre in München durchgeführt wurden⁹⁶⁾⁹⁷⁾⁹⁸⁾.

Nachstehend haben wir die Ergebnisse der mit den einzelnen Verbindungen durchgeführten Farbreaktionen zusammengestellt (Tabelle 8).

-
- 94) L.HÖRHAMMER u. R.HÄNSEL, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges.
284/56, 276 (1951)
95) L.HÖRHAMMER u. K.H.MÜLLER, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges.
287/59, 310 (1954)
96) L.STICH, Dissertation, München (1958)
97) R.SEMRAU, Dissertation, München (1958)
98) W.KIRMAYER, Dissertation, München (1959)

T a b e l l e 8

Farbreaktionen der Glykoside und Aglykone

Substanz	Redukt.Test Zn/HCl	Molisch- Reaktion	Briggs- FeCl ₃	Locker-Test HCl	Na-azet	Zirkon- Zitr.Test
Glykosid A	weinrot	+	braun	grün	braun	-
Glykosid B	zwiebelrot	+	braun	grün	braun	-
Glykosid C	zwiebelrot	+	braun violett	grün	braun violett	-
Glykosid D	karminrot	+	braun	grün	braun	+
Glykosid E	unverändert	-	-	-	-	-
Glykosid F	unverändert	-	-	-	-	-
Orientin	weinrot	+	braun	grün	braun	-
Scoparin	zwiebelrot	+	braun	grün	braun	-
Vitexin	zwiebelrot	+	braun violett	grün	braun violett	-
Hyperosid	karminrot	+	braun	grün	braun	+
Aesculetin	unverändert	-	-	-	-	-
Genistin	unverändert	-	-	-	-	-
Aglukon D	weinrot	-	gelb- braun	grün	braun- gelb	-
Aglukon E	unverändert	-	-	-	-	-
Aglukon G	zwiebelrot	-	braun	grün	braun	-
Quercetin	weinrot	-	gelb- braun	grün	braun- gelb	-
Genistein	unverändert	-	-	-	-	-
Luteolin	zwiebelrot	-	braun	grün	braun	-

Zeichenerklärung: + = positive Reaktion
- = negative Reaktion

b) Quantitative Hydrolysen

Für die bei Glykosid D durchgeführte quantitative Hydrolyse setzten wir 214.3 mg ein. Von Glykosid E verwendeten wir 100.2 mg Substanz.

Wir trockneten das Glykosid jeweils bis zur Gewichtskonstanz und versetzten die quantitativ eingewogene Substanz im Hydrolysenkölbchen mit 10 ml 10%iger Salzsäure. Die Lösungen hielten wir drei Stunden lang am Rückflußkühler in gelindem Sieden. Die Hydrolysen wurden auf dem Dampfbad ausgeführt.

Die Aglykone fielen nach längerem Stehen im Eisschrank aus. Wir sammelten sie auf einer Mikronutsche, wuschen mit Wasser bis zur Säurefreiheit aus und trockneten bis zur Gewichtskonstanz im Trockenschrank. Die gefundenen Werte der quantitativen Hydrolysen sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben:

T a b e l l e 9

Auswertung der quantitativen Hydrolysen der Glykoside D und E

Glykosid	Einwaage mg	Auswaage mg	% Aglukon gef.	% Aglukon ber.
Glykosid D	214.3	139.1	62.04	65.09
Glykosid E	100.2	61.9	61.07	62.50

Die Aglukone lösten wir in heißem Methanol von der Mikronutsche und kristallisierten sie dann bis zur Schmelzpunktskonstanz.

c) Zuckeranteil

Das saure Filtrat der quantitativen Hydrolyse und das Waschwasser der Aglukone neutralisierten wir jeweils durch Zugabe von wenig Silbernitrat, filtrierten das ausgefallene Silberchlorid ab und engten die Flüssigkeit im Vakuum auf etwa 2 ml ein.

Entwickeln der Papierchromatogramme mit Anilinphthalat

Zum Nachweis der Zucker trugen wir die konz. Lösung zusammen mit Testlösungen auf ein Papierchromatogramm auf und entwickel-

ten mit der Oberphase des Laufmittels Pyridin/Äthylazetat/Wasser (1+2+2) nach der absteigenden Methode. Das getrocknete Chromatogramm besprühten wir mit einer Lösung von 1.66 g Phthalsäure und 0.93 g Anilin in 100 ml wassergesättigtem Butanol und erhitzen es eine Viertelstunde im Trockenschrank auf 105° C. Die Zucker traten als braune Flecken in Erscheinung. R_F -Wert der Glukose 0.50, R_F -Wert der d-Galaktose 0.41.

Entwickeln der Chromatogramme mit Silbernitrat

Die Chromatogramme besprühten wir mit einer Lösung von 0.85 g Silbernitrat und 4.0 g Natriumhydroxyd in 25 ml 25%igem Ammoniak und 75 ml Wasser. Noch feucht hielten wir die Chromatogramme über ein Dampfbad. Dabei wurden an den Stellen, an denen sich Zucker befanden, das Silbernitrat zu Silber reduziert. Es trat ein schwarzer Fleck auf. Das nichtreduzierte Silbernitrat lösten wir durch Eintauchen der Chromatogramme in ein Bad von 10%iger Natriumthiosulfatlösung heraus. Auf diese Weise konnten wir die schwarzen Flecken des reduzierten Silbers fixieren.

Darstellung der Osazone

Die wie oben beschrieben neutralisierte und eingeeengte Zuckerlösung von Glykosid D und E versetzten wir in einem Zentrifugenglas mit dem gleichen Volumen einer frisch bereiteten Lösung von 1.0 g Phenylhydrazinchlorid und 1.5 g Natriumazetat in 10 ml Wasser. Wir versahen das Glas mit einem dünnen Steigrohr und erhitzen die Flüssigkeit eine Stunde im Wasserbad. Beim Erkalten fiel jeweils ein gelber Niederschlag aus. Wir zentrifugierten den Niederschlag ab, wuschen ihn mit Wasser, kristallisierten noch einmal aus 70%igem Methanol um und trockneten im Trockenschrank. Wir erhielten ein Glukosazon vom Schmelzpunkt 199° C, und ein Galaktosazon vom Schmelzpunkt 182° C. Der Schmelzpunkt des Glukosazons stimmte mit den Literaturschmelzpunkten überein, der Schmelzpunkt des Galaktosazons lag um einige Grade zu tief (Literatur Smp. = 188° C.).

d) CH- und CH₃O-Bestimmungen

Die CH- und OCH₃-Bestimmungen wurden vom mikroanalytischen Laboratorium im Max-Planck-Institut für Kohlenforschung in Mülheim/Ruhr durchgeführt. Sämtliche Analysen mit Ausnahme der Cumarinderivate wurden zuvor im Hochvakuum bei 90° bzw. 120° C konstant getrocknet.

T a b e l l e 10

Mikroanalytische Bestimmungen der Glykoside A,B,C,D,E,F,G,H

<u>Glykosid A</u>	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ (448.18)		Trocknung 120°/HV				
	Einwaage mg	CO ₂	H ₂ O	C %	H %		
	4.349	8.98	1.86	56.35	4.79		gef.
				56.10	4.48		ber.
<u>Glykosid B</u>	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁ (462.19)		Trocknung				
	Einwaage mg	CO ₂	H ₂ O	C %	H %	O %	OCH ₃ %
							1. 90°/HV
							2. 120°/HV
							3. 90°/HV
							4. 90°/HV
							5. 90°/HV
gef.	1. 3.956	8.28	1.82	57.12	5.15	-	6.15
	2. 3.874	8.07	1.77	56.85	5.11	-	-
	3. 4.606	9.57	2.06	56.70	5.00	-	-
	4. 2.635	-	-	-	-	37.74*)	-
	5. 2.935	-	-	-	-	37.61*)	-
ber.	-	-	-	57.14	4.76	38.09*)	6.07
<u>Glykosid C</u>	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀ (432.18)		Trocknung 90°/HV				
	Einwaage mg	CO ₂	H ₂ O	C %	H %		
	1.932	4.13	0.98	58.34	5.68		gef.
	-	-	-	58.30	4.60		ber.

*) Direktbestimmung

Fortsetzung Seite 61

Fortsetzung der Tabelle 10

<u>Glykosid D</u>	$C_{21}H_{20}O_{12}$	(464.2)	Trocknung Z.T./Vac./2mm			
Einwaage mg	CO_2	H_2O	C %	H %		
2.813	5.32	1.11	51.61	4.42	gef.	
-	-	-	54.31	4.31	ber.	
<u>Glykosid E</u>	$C_{21}H_{20}O_{10}$	(432.18)	Trocknung 90°/HV			
Einwaage mg	CO_2	H_2O	C %	H %		
4.099	8.75	1.80	58.26	4.91	gef.	
-	-	-	58.35	4.63	ber.	
<u>Substanz F</u>	$C_9H_6O_4$	(178.0)	ohne Trocknung			
Einwaage mg	CO_2	H_2O	C %	H %		
4.009	8.94	1.23	60.86	3.43	gef.	
-	-	-	60.66	3.40	ber.	
<u>Substanz H</u>	$C_{11}H_{12}O_4$	(208.09)	ohne Trocknung			
Einwaage mg	CO_2	H_2O	C %	H %		
3.511	7.98	1.66	62.03	5.29		
2.032	4.62	1.01	62.05	5.56	gef.	
4.074	9.26	1.98	62.03	5.44	ber.	
-	-	-	63.04	5.07		
Einwaage mg	ccm	n/50 $Na_2S_2O_3$	$OCH_3\%$			
5.376		2.46		29.29	gef.	
-		-		30.09	ber.	

T a b e l l e 11

Mikroanalytische Bestimmungen der Aglukone D, E und G

<u>Aglukon D</u>	$C_{15}H_{10}O_7$	(302.2)	Trocknung 120°/HV			
	Einwaage mg	CO ₂	H ₂ O	C %	H %	
	4.447	9.51	1.39	58.36	3.50	gef.
	-	-	-	59.60	3.31	ber.
<u>Aglukon E</u>	$C_{15}H_{10}O_5$	(270.2)	Trocknung 90°/HV			
	Einwaage mg	CO ₂	H ₂ O	C %	H %	
	1.866	4.29	0.69	62.74	4.14	gef.
	-	-	-	64.20	3.57	ber.
<u>Aglukon G</u>	$C_{15}H_{10}O_6$	(286.23)	Trocknung 1. Zim.T/HV 2. 50°/HV			
	Einwaage mg	CO ₂	H ₂ O	C %	H %	
gef. 1.	3.877	8.69	1.34	61.17	3.87	
gef. 2.	0.784	1.38	0.34	63.70	4.85	
ber.	-	-	-	62.90	3.49	

e) Entmethylierung

Durchführung: Etwa 50 mg Substanz B versetzten wir mit 3 ml 70%iger Jodwasserstoffsäure, 0.5 ml Phenolum liquefactum DAB 6 und 0.5 ml Essigsäureanhydrid. Das Entmethylierungskölbchen besitzt zwei Öffnungen. Durch die eine Öffnung leiteten wir einen gleichmäßigen Strom von CO₂. Die andere Öffnung trägt einen Rückflußkühler. Auf dem Paraffinbad erhitzen wir das Gemisch bei 150° C zwei Stunden lang. Dann gossen wir das noch heiße Reaktionsgemisch in Eis und ließen es einige Stunden im Kühlschrank stehen. Den schwarzen Niederschlag filtrierten wir ab, wuschen ihn mit Wasser und lösten ihn in Methanol. Die Lösung, die schwarzgrün gefärbt war, wurde so zur Chromatographie verwendet. Als Lösungsmittelsysteme benutzten wir ÄAW und IAW.

Das Entmethylierungsprodukt von Substanz B war nicht wie erwartet Orientin, sondern zeigte auf dem Papierchromatogramm die Laufhöhen und Farbreaktionen von Luteolin. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die auftretenden Farbreaktionen.

T a b e l l e 12

Papierchromatographisches Verhalten des Entmethylierungsproduktes

Substanz	IAW	AAW	unbespr.	AlSO ₄	bas.Bleiazetat
Entmethylierungsprodukt	0.14	0.79	dunkel	gelb	orange-gelb
Luteolin	0.14	0.79	dunkel	gelb	orange-gelb

Ein kristallines Produkt konnten wir aus dieser Reaktion nicht gewinnen, daher eluierten wir den Chromatogrammfleck des Entmethylierungsproduktes mit Methanol aus dem Papier und nahmen das UV-Spektrum auf und verglichen mit Luteolin. Die Maxima sind in folgender Tabelle angeführt.

T a b e l l e 13

UV-Maxima des Chromatogrammfleckes der Entmethylierung und des Luteolins

Substanz	1. Maximum mμ	2. Maximum mμ
Entmethylierungsprodukt	350	256
Luteolin auth.	350	257

f) Perjodsäureoxydation⁹⁹⁾

10 mg Substanz wurden genau gewogen und in einem Siedekölbchen mit 5 ml einer wässrigen 2%igen Natrium-perjodatlösung versetzt. Das Gemisch erhitzen wir unter Rückflußkühlung 20 Minuten zum Sieden. Nach dem Abkühlen setzten wir 1 - 2 ml Äthylenglycol zu, um das überschüssige Natriumperjodat zu zerstören. Die Titration erfolgte nach Vorlage von 5 ml 1/10 n-KOH durch Rücktitration mit 1/10 n-HCl. Als Indikator diente Methylorange.

Die Substanz wurde zuerst in einem Blindversuch getestet, indem wir ohne Zusatz von Perjodat titrierten. Eingewogen wurden 1.3 mg Scoparin, vorgelegt 5.0 ml 1/10 n KOH. Zur Rücktitration verbrauchten wir 4.86 ml n-HCl. Der Faktor der n/10 HCl war 1.022. Das ergibt einen tatsächlichen Verbrauch von 4.967 ml 1/10 n HCl. Scoparin reagiert etwas sauer, so daß zur Neutralisation von 1.3 mg Scoparin 0.033 ml n/10 KOH verbraucht werden. Das bedeutet, auf 1 mg berechnet, einen Verbrauch von 0.025 ml n/10 KOH im Leerversuch.

T a b e l l e 14
Perjodsäureoxydation

	Einwaage mg	Vorlage n/10 KOH ml	Verbrauch n/10 HCl F = 1.022 ml	Umgerechnet auf n/10 HCl mit F = 1.0 - ml
1.Versuch	6.8	5	4.1	4.19
2.Versuch	9.8	5	3.86	3.95

	Verbrauch n/10 KOH ml	Tatsächlicher Verbrauch n/10 KOH zur Neutra- lisation von Ameisensäure ml	entspricht mg Ameisen- säure	entspricht mol Ameisen- säure
1.Versuch	0.17	0.64	2.94	4.3
2.Versuch	0.25	0.80	3.68	3.7

99) A.SACHS, Dissertation München in Vorbereitung.

g) Azetylierungen

30 mg Substanz versetzten wir in einem Azetylierungskülbchen mit 5 ml Essigsäureanhydrid, 5 Tropfen Pyridin und 0.3 g frisch geschmolzenem wasserfreien Natriumazetat. Die Mischung hielten wir im Falle des Scoparins und Orientins 8 Std. lang bei 100°C in gelindem Sieden. Die Substanzen Genistin und Aesculetin benötigten nur eine Azetylierungsdauer von zwei Stunden. Das farblose Reaktionsgemisch gossen wir noch heiß auf Eis und stellten es über Nacht in den Kühlschrank. Den Niederschlag sammelten wir auf einer Mikronutsche und wuschen bis zur Säurefreiheit mit Wasser. In jedem Fall kristallisierten wir das Azetylprodukt aus Methanol um.

Die mikroanalytischen Bestimmungen ergaben gute Übereinstimmung mit den berechneten Werten und sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben.

T a b e l l e 15

CH₃CO-Bestimmungen

Azetat von	Smp.	Einwaage mg	Verseif.Mittel - NaOH	Verseif. Dauer min.	ml n/100 NaOH	CH ₃ CO
Glykosid A	215°	6.704	1 n meth.alk. - NaOH	90	-	gef. 42.05 ber. 43.80
Glykosid B	241°	5.390	1 n meth.alk. - NaOH	90	4.09	gef. 32.66 ber. 39.08
Glykosid E	188°	4.191	1 n meth.alk. - NaOH	90	3.88	gef. 39.85 ber. 39.65
Glykosid F	134°	3.105	1 n meth.alk. - NaOH	90	2.53	gef. 35.07 ber. 32.82

Von den azetylierten Substanzen wurden auch CH-Bestimmungen durchgeführt. Diese sind in der nachstehenden Tabelle wiedergegeben.

T a b e l l e 16

Mikronalytische Bestimmungen der Azetate von Substanz A,B,E und F

<u>Substanz A</u>	$C_{21}H_{12}O_3 (COCH_3)_8$		Trocknung: 90°/HV			
	Einwaage mg	CO ₂	H ₂ O	C %	H %	
	4.237	8.64	1.76	55.65	4.65	gef.
				56.24	4.46	ber.
<u>Substanz B</u>	Einwaage mg	CO ₂	H ₂ O	C %	H %	
	4.731	10.08	2.07	58.14	4.90	gef.
				57.14	4.76	ber.
<u>Substanz E</u>	$C_{21}H_{14}O_{10} (COCH_3)_6 (684.2)$		Trocknung: 90°/HV			
	Einwaage mg	CO ₂	H ₂ O	C %	H %	
	4.467	9.42	1.88	57.55	4.71	gef.
				57.16	4.67	ber.
<u>Substanz F</u>	$C_{13}H_{10}O_6 = C_9H_6O_4 (OCCH_3)_2 (262.09)$		Trocknung: 90°/HV			
	Einwaage mg	CO ₂	H ₂ O	C %	H %	
	4.374	9.54	1.53	59.52	3.91	gef.
				59.05	3.81	ber.

h) Alkalispaltung

Durchführung: 200 mg Substanz B versetzten wir mit 10 ml 25%iger wässriger Kalilauge und erhitzen das Gemisch am Rückflukühler 6 Stunden lang auf der Flamme des Bunsenbrenners. Durch das Gemisch leiteten wir einen Stickstoffstrom, um eine evtl. Oxydation zu vermeiden. Das erkaltete Reaktionsgemisch, das sich im Laufe der Spaltung von gelb nach braun verfärbt hatte, verdünnten wir mit 100 ml Wasser und säuerten es mit 25%iger Salzsäure an.

Die Lösung wurde dreimal mit je 100 ml Äther ausgeschüttelt, Die Ätherlösung engten wir auf etwa 100 ml auf dem Dampfbad ein und schüttelten sie zweimal mit je 100 ml einer 5%igen Natriumbikarbonatlösung aus.

Die zurückbleibende Ätherlösung enthielt den phenolischen Anteil der Abbauprodukte der Alkalispaltung.

Die wässrige Natriumbikarbonatlösung enthielt den sauren Anteil der Abbauprodukte der Alkalispaltung. Nach dem Ansäuern der Lösung mit 5%iger Salzsäure schüttelten wir sie dreimal mit je 300 ml Äther aus, dampften diesen auf dem Dampfbad ab, und nahmen den Rückstand in Methanol auf. Die methanolische Lösung des Säureanteils chromatographierten wir in IAW (siehe Tabelle 17).

Entwickeln des Chromatogramms

Das getrockneten Chromatogramm besprühten wir zunächst mit einer Mischung gleicher Teile einer 1%igen Lösung von Sulfanilsäure in n/1 Salzsäure und 1%iger Natriumnitritlösung. Nach dem Trocknen an der Luft besprühten wir das Chromatogramm mit n/1 alkoholischer Kalilauge. Phenolische Produkte geben dabei gelbe, braune, violette oder schwarze Flecke.

Papierchromatographischer Vergleich

Als Testsubstanz für den Säureanteil von Glykosid B ließen wir in IAW Vanillinsäure mitlaufen. Zum Vergleich des phenolischen Anteils zogen wir Phloroglucin hinzu.

T a b e l l e 17

Alkalispalt- produkte	IAW (2+5+5)	Diazo reag.	n/1 KOH Tageslicht
Säureanteil	0.72	-	gelb
Vanillinsäure	0.72	-	gelb
Phenolischer Anteil	0.61	violett	rotgelb
Phloroglucin	0.61	violett	rotgelb

Untersuchung des Säureanteils

Wir untersuchten nur den Säureanteil der Substanz B näher, den wir aus der methanolischen Lösung des Säureanteils der Alkalispaltung als weiße Substanz in langen sternförmigen Nadeln gewannen. Der Schmelzpunkt lag bei 206°C und entsprach damit dem für Vanillinsäure geforderten Literaturwert. Die mikronanalytische Bestimmung entsprach dem für Vanillinsäure berechneten Wert und ist in der folgenden Tabelle wiedergegeben.

T a b e l l e 18

CH-Bestimmung der Vanillinsäure

Vanillinsäure						
Einwaage mg	CO ₂	H ₂ O	C %	H %		
1.600	3.33	0.71	56.80	4.97	gef.	
			57.01	4.10	ber.	

Wir führten auch eine qualitative Messung des UV-Spektrums des Säureanteils der Alkalispaltung durch und verglichen diese mit dem von auth. Vanillinsäure:

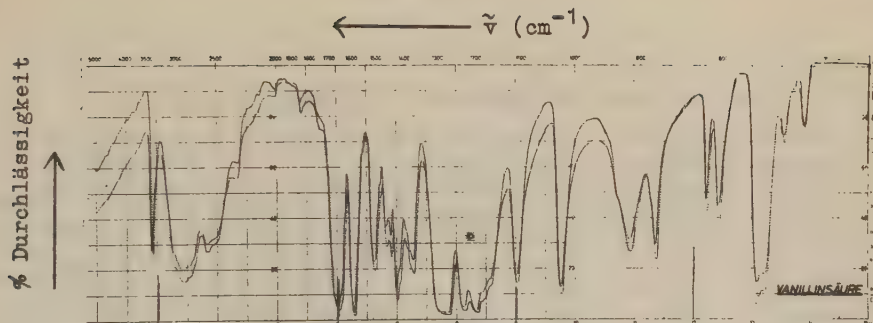


Abb. 19

Überlagerungsaufnahme der IR-Spektren der Säure aus Glykosid B und Vanillinsäure

T a b e l l e 19

UV-Maxima der Substanzen

Substanz	1. Max. mμ	2. Max. mμ
Säure aus Glykosid B	290	260
Vanillinsäure	290	260

i) Mikrosublimation

Zur Reinigung und zum Nachweis der aufgefundenen Cumarine benutzten wir ein Ganzglasmikrosublimationsgerät nach KLEIN, das mit einem Kühlrohr versehen war und mittels einer Wasserstrahlpumpe evakuiert werden konnte. Das Gerät tauchten wir mit seinem Boden in ein Ölbad ein, versahen die Apparatur mit einem Thermometer und erhitzen das Ölbad langsam. Die Sublimation begann im Falle des Aesculetins bei 250°C, bei Substanz H, dem 6,7-Dimethyläthers des Dihydrocumarins bei 125°C. Die Nadeln setzten sich an der Kühlfläche des Gerätes ab und wurden nach Beendigung der Sublimation mechanisch entfernt.

4. Physikalische Untersuchungen

a) UV-Spektroskopie

1. Normalspektren

Wir wogen zwischen 0.5 und 1.7 mg der Substanzen auf der Mettler-Halbmikrowaage genau ab, lösten diese in 100 ml Methanol p.a. und führten die Messungen in Quarzküvetten von 1 cm Schichtdicke mit dem Zeiss-Opton-Spektrophotometer M 4 Q durch. (siehe Tabelle 20)

T a b e l l e 20

Normalspektren der Glykoside A,B,C,D,E,F,G,H

Substanz	Einwaage mg	1.Max.	2.Max.	E spez.		log.	
		mμ	mμ	1.Max.	2.Max.	1.Max.	2.Max.
Glykosid A	1.3	351	258	36.16	35.16	4.210	4.210
Glykosid B	1.7	345	270	41.17	32.94	4.271	4.181
Glykosid C	1.2	333	271	35.04	35.08	4.173	4.175
Glykosid D	1.4	360	260	25.07	29.02	4.068	4.127
Glykosid E	0.5	Inf1.325	263	-	126.00	-	5.742
Glykosid F	1.2	350	300 260	178.00	28.01	4.028	4.695
Glykosid G	1.3	350	256	36.09	30.00	5.002	4.810
Glykosid H	1.3	-	240	-	115.30	-	5.375

Glykosid E zeigt als Isoflavon nur ein ausgeprägtes Maximum und Glykosid F besitzt als Cumarinkörper ein drittes Maximum bei 300 mμ. Substanz H ist ein Dihydrocumarin und verfügt nur über ein Maximum.

2. UV-Verschiebungen

Zur Klärung der Substitutionsverhältnisse war es nur bei Glykosid B nötig, die UV-Verschiebungen zu messen. Die zu messende methanolische Lösung von Glykosid B sättigten wir im ersten Fall durch Zugabe eines Überschusses frisch geschmolzenem Natriumazetats. Für die zweite Messung mischten wir eine konzentrierte Borsäurelösung in Methanol p.a. mit der Standardlösung und sättigten ebenfalls durch Zugabe eines Überschusses von Natriumazetat. Im einzelnen verweisen wir auf Arbeiten aus dem Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre^{100) 101)}.

Die aufgetretenen Maxima haben wir in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

100) L.STICH, Dissertation, München (1958)

101) H.GRASMAIER, Dissertation, München (1959)

T a b e l l e 21
UV-Maxima von Glykosid B

Lösungsmittel und Zusätze			Verschiebung	
	1.Max. m μ	2.Max. m μ	1.Max. m μ	2.Max. m μ
Methanollösung	345	270	-	-
Methanollösung + Natriumazetat	310	395	+40	+45
Methanollösung + Natriumazetat + Borsäure	345 (Inflexion)	265 (Inflexion)	-	- 5

b) IR-Spektroskopie

Die genau gewogenen Glykoside und Aglukone wurden mit Kaliumbromid gemischt und in Form von Preßlingen im Perkin-Elmer-Infrarotspektrophotometer Nr. 21 gemessen. Die Konzentrationen sind in Tabelle 22 angegeben.

T a b e l l e 22
Einwaagen zur Messung der IR-Spektren

Glykosid A	1035 γ	300 mg KBr
Glykosid B	900 γ	300 mg KBr
Glykosid C	1.03 mg	300 mg KBr
Glykosid D	1.02 mg	300 mg KBr
Glykosid E	840 γ	300 mg KBr
Glykosid F	980 γ	300 mg KBr
Glykosid G	930 γ	300 mg KBr
Glykosid H	1.03 mg	300 mg KBr

Herkunft der Testsubstanzen:

O r i e n t i n	isoliert aus Polygonum orientale L. von F.GLOGGENGIESSER, Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München
S c o p a r i n	freundlicherweise überlassen von Herrn Professor Dr. R.PARIS, Faculté de Matière Médical, Paris
V i t e x i n	isoliert aus Polygonum orientale L. von F.GLOGGENGIESSER, Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München
H y p e r o s i d	isoliert aus Betula verrucosa L. von H.WAGNER, Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München
A e s c u l e t i n	bezogen von der Firma Carl Roth, Karlsruhe
L u t e o l i n	isoliert aus Spartium junceum L. von H.S.DHINGRA, Institut für Pharma- zeutische Arzneimittellehre der Univer- sität München

A N H A N G

Arzneimittel die Drogenauszüge aus
dem Besenginster oder Spartein ent-
halten.

(zusammengestellte nach der Arzneimittelliste "Rote Liste"(1960))

Spartein "Asal" (Spartepur) der Firma Asal, Berlin-West
Cordisanol-Tropfen der Firma Dr.Schwarz, Sanol-Präparate,
Monheim/Rhld.

Diffucord-Tropfen der Dolorgiet-Werke, Bad Godesberg/Rhld.

Ginstasan-Tropfen der Firma Curta u. Co.,G.m.b.H.,Frankfurt/M.

Spartiol-Tropfen der Firma G. Klein, Gm.b.H., Harmensbach/
Schwarzwald

Venacton-Tropfen der Firma G. Klein, G.m.b.H.,Harmensbach/
Schwarzwald

Teep der Firma Madaus, Köln

Plantrit der Firma Schwabe, Karlsruhe

Barecal-Tropfen der Firma Siegfried, Arzneimittel, Säckingen

Cor-Dragees der Firma Schuck K.G., Schwaig üB.Nürnberg

Card-Tropfen der Firma Salus-Werke, München 9, Schönstr.10

✓ Venoruton P 4-Tropfen der Firma Zyma-Blaes, München 25

Sed-Ariston-Tropfen, Deutsche Arzneimittel-Ges., Berlin-Lankwitz

Normotin-Tropfen der Firma W. Seidel, chem.pharm.Fabrik,
Göppingen/Württemberg

L e b e n s l a u f

Am 27. Mai 1928 wurde ich, Peter Beyersdorff, als Sohn des Kaufmanns Willy Michaelis und seiner Ehefrau Charlotte geb. Gerth in Stettin geboren.

Nach dem Tode meines Vaters im Jahre 1928 siedelte meine Mutter mit mir nach Berlin über.

Hier besuchte ich die Grundschule vom Jahre 1934 bis 1940. Als meine Mutter 1938 eine zweite Ehe mit dem Bauingenieur Erwin Beyersdorff einging, wurde ich adoptiert.

Ich besuchte von 1940 bis 1949 die Oberschule für Jungen in Berlin-Treptow und legte dort am 14. Juni 1949 die Reifeprüfung ab. Im gleichen Jahr begann ich meine Lehrzeit als Apothekerpraktikant in der Charlotten-Apotheke Berlin-Schöneweide, die ich am 2. Oktober 1951 mit der Pharmazeutischen Vorprüfung beendete. Danach arbeitete ich bis zum Winter-Semester 1953 als Assistent in verschiedenen Apotheken und begann dann das Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen, wo ich am 29. Oktober 1956 die Pharmazeutische Prüfung ablegte.

Vom Dezember 1956 bis Juli 1959 war ich in mehreren Apotheken als Kandidat der Pharmazie und als Apotheker tätig. Die Bestallung als Apotheker erhielt ich am 31. Oktober 1957.

Im Sommer-Semester 1959 begann ich am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München unter Leitung von Herrn Professor Dr. L. Hörhammer mit der Ausarbeitung der vorliegenden Arbeit.

